

Europäisches  
Patentamt

European Patent  
Office

Office européen  
des brevets

PCT/EP04/08624



### Bescheinigung

### Certificate

### Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten internationalen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the international patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet international spécifiée à la page suivante.

Den Haag, den  
The Hague,  
La Haye, le

06.10.2004

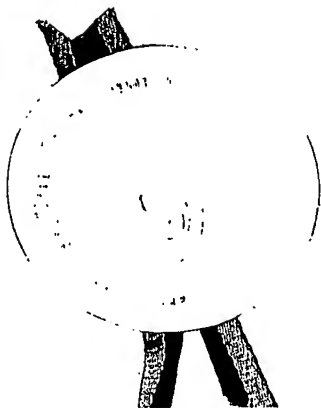
Der Präsident des Europäischen Patentamts  
Im Auftrag  
For the President of the European Patent Office  
Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

Mirella DELEYE

Patentanmeldung Nr.  
Patent application no.  
Demande de brevet n°

PCT/EP 03/09106

BEST AVAILABLE COPY



blatt 2 der Bescheinigung  
heet 2 of the certificate  
age 2 de l'attestation



Anmeldung Nr.:  
Application no.:  
Demanche n°:

PCT/EP 03/09106

Anmelder:  
Applicant(s):  
Demancheur(s):

1. SUNGENE GMBH & CO. KGAA - Gatersleben, Deutschland
2. SAUER, Matt - Quedlinburg, Deutschland (nur US)
3. FLACHMAN, Ralf - Quedlinburg, Deutschland (nur US)

Bezeichnung der Erfindung:  
Title of the invention:  
Titre de l'invention:

Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden in genetisch veränderten Organismen

Anmeldetag:  
Date of filing:  
Date de dépôt:

18. August 2003 (18.08.2003)

In Anspruch genommene Priorität(en)  
Priority(ies) claimed  
Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:  
Country:  
Pays: Deutschland

Tag:  
Date: 13. November 2002  
Date: (13.11.2002)

Aktenzeichen: 10253112.9  
File no.  
Numéro de dépôt:

Benennung von Vertragsstaaten : Siehe Formblatt PCT/RO/101 (beigefügt)  
Designation of contracting states : See Form PCT/RO/101 (enclosed)  
Désignation d'états contractants : Voir Formulaire PCT/RO/101 (ci-joint)

Bemerkungen:  
Remarks:  
Remarques:

Weitere Anmelder:

4. KLEBSATTEL, Martin - Quedlinburg, Deutschland (nur US)
5. SCHOPFER, Christel Renate - Quedlinburg, Deutschland (nur US)

Weitere Prioritätsansprüche:

Deutschland

16. Dezember 2002  
(16.12.2002)

10258971.2

**Weitere Prioritätsansprüche:**

Deutschland	20. August 2002 (20.08.2002)	10238980.2
Deutschland	20. August 2002 (20.08.2002)	10238978.0
Deutschland	20. August 2002 (20.08.2002)	10238979.9

## PCT-ANTRAG

0000054058

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 06.08.2003 11:04:47 AM

V	Bestimmung von Staaten	
V-1	Regionales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	<p>AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW und jeder weitere Staat, der Mitgliedstaat des Harare-Protokolls und Vertragsstaat des PCT ist</p> <p>EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM und jeder weitere Staat, der Mitgliedsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist</p> <p>EP: AT BE BG CH&amp;LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL PT RO SE SI SK TR und jeder weitere Staat, der Mitgliedsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist</p> <p>OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG und jeder weitere Staat, der Mitgliedstaat der OAPI und Vertragsstaat des PCT ist</p>
V-2	Nationales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	<p>AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&amp;LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NI NO NZ OM PG PH PL PT RO RU SC SD SE SG SK SL SY TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM ZW</p>
V-5	Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen Zusätzlich zu den unter Punkten V-1, V-2 and V-3 vorgenommenen Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der nachstehend unter Punkt V-6 angegebenen Staaten. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt.	
V-6	Staaten, die von der Erklärung über vorsorgliche Bestimmungen ausgenommen werden	KEINE
VI-1	Priorität einer früheren nationalen Anmeldung beansprucht	
VI-1-1	Anmeldedatum	13 November 2002 (13.11.2002)
VI-1-2	Nummer	10253112.9
VI-1-3	Staat	DE



## Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden in genetisch veränderten Organismen

## Beschreibung

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität aufweisen, die genetisch veränderten Organismen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von Ketocarotinoidextrakten.

10

Carotinoide werden de novo in Bakterien, Algen, Pilzen und Pflanzen synthetisiert. Ketocarotinoide, also Carotinoide, die mindestens eine Keto-Gruppe enthalten, wie beispielsweise Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin sind natürliche Antioxidantien und Pigmente, die von einigen Algen und Mikroorganismen als Sekundärmetabolite produziert werden.

15

Aufgrund ihrer farbgebenden Eigenschaften werden die Ketocarotinoide und insbesondere Astaxanthin als Pigmentierhilfsstoffe in der Tierernährung, insbesondere in der Forellen-, Lachs- und Shrimpszucht verwendet.

20

Die Herstellung von Astaxanthin erfolgt heutzutage größtenteils durch chemische Syntheseverfahren. Natürliche Ketocarotinoide, wie beispielsweise natürliches Astaxanthin, werden heutzutage in biotechnologischen Verfahren in kleinen Mengen durch Kultivierung von Algen, beispielsweise *Haematococcus pluvialis* oder durch Fermentation von gentechnologisch optimierten Mikroorganismen und anschließender Isolierung gewonnen.

25

Ein wirtschaftliches biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von natürlichen Ketocarotinoiden ist daher von großer Bedeutung.

30

Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase und die entsprechenden Proteinsequenzen sind aus verschiedenen Organismen isoliert und annotiert worden, wie beispielsweise Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase aus *Agrobacterium aurantiacum* (EP 735 137, Accession NO: D58420), aus *Alcaligenes sp. PC-1* (EP 735137, Accession NO: D58422), *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille und *Haematococcus pluvialis*, NIES-

35

144 (EP 725137, WO 98/18910 und Lotan et al, FEBS Letters 1995, 364, 125-128, Accession NO: X86782 und D45881), *Paracoccus marcusii* (Accession NO: Y15112), *Synechocystis* sp. Strain PC6803 (Accession NO: NP\_442491), *Bradyrhizobium* sp. (Accession NO: AF218415) und *Nostoc* sp. PCC 7120 (Kaneko et al, DNA Res. 2001, 8(5), 205 - 213; Accession NO: AP003592, BAB74888).

EP 735 137 beschreibt die Herstellung von Xanthophyllen in Mikroorganismen, wie beispielsweise *E. coli* durch Einbringen von Ketolase-Genen (crtW) aus *Agrobacterium aurantiacum* oder *Alcaligenes* sp. PC-1 in Mikroorganismen.

Aus EP 725 137, WO 98/18910, Kajiwaru et al. (Plant Mol. Biol. 1995, 29, 343-352) und Hirschberg et al. (FEBS Letters 1995, 364, 125-128) ist es bekannt, Astaxanthin durch Einbringen von Ketolase-Genen aus *Haematococcus pluvialis* (crtW, crtO oder bkt) in *E. coli* herzustellen.

Hirschberg et al. (FEBS Letters 1997, 404, 129-134) beschreiben die Herstellung von Astaxanthin in *Synechococcus* durch Einbringen von Ketolase-Genen (crtO) aus *Haematococcus pluvialis*. Sandmann et al. (Photochemistry and Photobiology 2001, 73(5), 551-555) beschreiben ein analoges Verfahren, das jedoch zur Herstellung von Canthaxanthin führt und nur Spuren Astaxanthin liefert.

WO 98/18910 und Hirschberg et al. (Nature Biotechnology 2000, 18(8), 888-892) beschreiben die Synthese von Ketocarotinoiden in Nektarien von Tabakblüten durch Einbringen des Ketolase-Gens aus *Haematococcus pluvialis* (crtO) in Tabak.

WO 01/20011 beschreibt ein DNA Konstrukt zur Produktion von Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin, in Samen von Ölsaatzpflanzen wie Raps, Sonnenblume, Sojabohne und Senf unter Verwendung eines Samen-spezifischen Promotors und einer Ketolase aus *Haematococcus pluvialis*.

Alle im Stand der Technik beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden und insbesondere die beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Astaxanthin weisen den Nachteil auf, daß die transgenen Organismen eine große Menge an hydroxylierten Nebenprodukten, wie beispielsweise Zeaxanthin und Adonixanthin liefern.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen zur Verfügung zu stellen, bzw. weitere genetisch veränderte Organismen, die Ketocarotinoide herstellen, zur Verfügung zu stellen, die die vorstehend beschriebenen Nachteile des Standes der Technik in geringerem Maße oder nicht mehr aufweisen.

Demgemäß wurde ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden gefunden, indem man genetisch veränderte Organismen kultiviert, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität aufweisen und die veränderte Ketolase-Aktivität durch eine Ketolase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

Die erfindungsgemäßen Organismen wie beispielsweise Mikroorganismen oder Pflanzen sind vorzugsweise als Ausgangsorganismen natürlicherweise in der Lage, Carotinoide wie beispielsweise  $\beta$ -Carotin oder Zeaxanthin herzustellen, oder können durch genetische Veränderung, wie beispielsweise Umregulierung von Stoffwechselwegen oder Komplementierung in die Lage versetzt werden, Carotinoide wie beispielsweise  $\beta$ -Carotin oder Zeaxanthin herzustellen.

Einige Organismen sind als Ausgangs- oder Wildtyporganismen bereits in der Lage, Ketocarotinoid wie beispielsweise Astaxanthin oder Canthaxanthin herzustellen. Diese Organismen, wie beispielsweise *Haematococcus pluvialis*, *Paracoccus marcusii*, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Bacillus circulans*, *Chlorococcum*, *Phaffia rhodozyma*, *Adonisröschen*, *Neochloris wimmeri*, *Protosiphon botryoides*, *Scotiellopsis oocystiformis*, *Scenedesmus vacuolatus*, *Chlorella zofingiensis*, *Ankistrodesmus braunii*, *Euglena sanguinea*, *Bacillus atrophaeus*, *Blakeslea* weisen bereits als Ausgangs- oder Wildtyporganismus eine Ketolase-Aktivität auf.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden daher als Ausgangsorganismen Organismen verwendet, die bereits als Wildtyp oder Ausgangsorganismus eine Ketolaseaktivität aufweisen. In dieser Ausführungsform bewirkt die genetische Veränderung eine Erhöhung der Ketolase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp oder Ausgangsorganismus.

Unter Ketolase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Ketolase verstanden.

Unter einer Ketolase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten,  $\beta$ -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Keto-Gruppe einzuführen.

5

Insbesondere wird unter einer Ketolase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\beta$ -Carotin in Canthaxanthin umzuwandeln.

10

Dementsprechend wird unter Ketolase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Ketolase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin bzw. gebildete Menge Canthaxanthin verstanden.

15

Bei einer erhöhten Ketolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Ketolase die umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin bzw. die gebildete Menge Canthaxanthin erhöht.

20

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Ketolase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Ketolase-Aktivität des Wildtyps.

Unter dem Begriff "Wildtyp" wird erfindungsgemäß der entsprechende Ausgangsorganismus verstanden.

25

Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff "Organismus" der Ausgangsorganismus (Wildtyp) oder ein erfindungsgemäßer, genetisch veränderter Organismus oder beides verstanden werden.

30

Vorzugsweise und insbesondere in Fällen, in denen der Organismus oder der Wildtyp nicht eindeutig zugeordnet werden kann, wird unter "Wildtyp" für die Erhöhung oder Verursachung der Ketolase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und die Erhöhung des Gehalts an Ketocarotinoiden jeweils ein Referenzorganismus verstanden.

35

Dieser Referenzorganismus ist für Mikroorganismen, die bereits als Wildtyp eine Ketolase Aktivität aufweisen, vorzugsweise *Haematococcus pluvialis*.

5 Dieser Referenzorganismus ist für Mikroorganismen, die als Wildtyp keine Ketolase Aktivität aufweisen, vorzugsweise *Blakeslea*.

Dieser Referenzorganismus ist für Pflanzen, die bereits als Wildtyp eine Ketolase-Aktivität aufweisen, vorzugsweise *Adonis aestivalis*, *Adonis flammeus* oder *Adonis annuus*, besonders bevorzugt *Adonis aestivalis*.

10

Dieser Referenzorganismus ist für Pflanzen, die als Wildtyp keine Ketolase-Aktivität in Blütenblätter aufweisen, vorzugsweise *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Tagetes lucida*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri*, *Tagetes minuta* oder *Tagetes campanulata*, besonders bevorzugt *Tagetes erecta*.

15

Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Organismen und in Wildtyp- bzw. Referenzorganismen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

20 Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in Pflanzen- oder Mikroorganismenmaterial erfolgt in Anlehnung an die Methode von Frazer et al., (J. Biol. Chem. 272(10): 6128-6135, 1997). Die Ketolase-Aktivität in pflanzlichen oder Mikroorganismus-Extrakten wird mit den Substraten  $\beta$ -Carotin und Canthaxanthin in Gegenwart von Lipid (Sojalecithin) und Detergens (Natriumcholat) bestimmt. Substrat/Produkt-Verhältnisse aus den

25 Ketolase-Assays werden mittels HPLC ermittelt.

Die Erhöhung der Ketolase-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Translations- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, gegenüber dem Wildtyp, beispielsweise durch Induzierung

30 des Ketolase-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, in den Organismus.

Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, wird

35 erfindungsgemäß in dieser Ausführungsform auch die Manipulation der Expression der Organismen eigenen endogenen Ketolasen verstanden. Dies kann beispielsweise

durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Ketolase kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine veränderte oder vorzugsweise erhöhte Expressionsrate mindestens eines endogenen Ketolase Gens zur Folge hat, kann durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

5

Es ist wie vorstehend beschrieben möglich, die Expression mindestens einer endogenen Ketolase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

10

Des weiteren kann eine erhöhte Expression mindestens eines endogenen Ketolase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein im Wildtyporganismus nicht vorkommendes oder modifiziertes Regulatorprotein mit dem Promotor dieser Gene in Wechselwirkung tritt.

15

Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

20

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Ketolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

25

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolasen kodieren, in die Organismen, wobei die Ketolasen die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz enthalten, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

30

In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Ketolase-Gen vor, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von die-

35

ser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

5 In dieser Ausführungsform weist der erfindungsgemäße genetisch veränderte Organismus dementsprechend mindestens eine exogene (=heterologe) Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, auf oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, auf, wobei die Ketolasen die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren  
10 abgeleitete Sequenz enthalten, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

In einer anderen, bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden als Ausgangsorganismen Organismen verwendet, die als Wildtyp keine Ketolaseaktivität aufweisen.  
15

In dieser bevorzugten Ausführungsform verursacht die genetische Veränderung die Ketolase-Aktivität in den Organismen. Der erfindungsgemäße genetisch veränderte Organismus weist somit in dieser bevorzugten Ausführungsform im Vergleich zum genetisch nicht veränderten Wildtyp eine Ketolase-Aktivität auf und ist somit vorzugsweise in der Lage, transgen eine Ketolase zu exprimieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.  
20

25 In dieser bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, analog zu der vorstehend beschriebenen Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, vorzugsweise durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, in den Ausgangsorganismus.  
30

35 Dazu kann in beiden Ausführungsformen prinzipiell jede Nukleinsäuren, die eine Ketolase kodiert, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser

Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, verwendet werden.

- 5 Die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, führt im erfindungsgemäßen Verfahren überraschenderweise zu Ketocarotinoiden mit einer geringeren Menge an hydroxylierten Nebenprodukten als bei der Verwendung der im Stand der Technik verwendeten Ketolase-Gene.

- 10 Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können beispielsweise eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein.

- Bei genomischen Ketolase-Sequenzen aus eukaryotischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall, dass der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Ketolase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

- Beispiele für Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, und die entsprechenden Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, die im erfindungsgemäßen Verfahren vorteilhaft verwendet werden können, sind beispielsweise Sequenzen aus

- 25 *Nostoc sp. Strain PCC7120* (Accession NO: AP003592, BAB74888; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 1, Protein SEQ ID NO: 2),

- 30 *Nostoc punctiforme* ATTC 29133, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ\_AABC01000195, Basen-paar 55,604 bis 55,392 (SEQ ID NO: 3); Protein: Acc.-No. ZP\_00111258 (SEQ ID NO: 4) (als putatives Protein annotiert) oder

- Nostoc punctiforme* ATTC 29133, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ\_AABC01000196, Basen-paar 140,571 bis 139,810 (SEQ ID NO: 5), Protein: (SEQ ID NO: 6) (nicht annotiert),



*Synechococcus* sp. WH 8102, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ\_AABD01000001, Basenpaar 1,354,725-1,355,528 (SEQ ID NO: 46), Protein: Acc.-No. ZP\_00115639 (SEQ ID NO: 47) (als putatives Protein annotiert),

- 5 *Nodularia spumigena* NSOR10, (Accession NO: AY210783, AAO64399; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 52, Protein: SEQ ID NO: 53)

oder von diesen Sequenzen abgeleitete Ketolasesequenzen wie beispielsweise

- 10 die Ketolasen der Sequenz SEQ ID NO: 8 oder 10 und die entsprechenden kodierenden Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 7 oder SEQ ID NO: 9, die beispielsweise durch Variation/Mutation aus der Sequenz SEQ ID NO: 4 bzw. SEQ ID NO: 3 hervorgehen,
- 15 die Ketolasen der Sequenz SEQ ID NO: 12 oder 14 und die entsprechenden kodierenden Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 11 oder SEQ ID NO: 13, die beispielsweise durch Variation/Mutation aus der Sequenz SEQ ID NO: 6 bzw. SEQ ID NO: 5 hervorgehen, oder
- 20 die Ketolasen der Sequenz SEQ ID NO: 49 oder 51 und die entsprechenden kodierenden Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 48 oder SEQ ID NO: 50, die beispielsweise durch Variation bzw. Mutation aus der Sequenz SEQ ID NO: 47 bzw. SEQ ID NO: 46 hervorgehen.
- 25 Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können, lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der vorstehend beschriebenen Sequenzen SEQ ID NO:  
30 2 leicht auffinden.

- 35 Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von den Sequenzen SEQ ID NO: 1 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

Die Hybridisierung kann unter moderaten (geringe Stringenz) oder vorzugsweise unter stringenten (hohe Stringenz) Bedingungen erfolgen.

Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben.

Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrilles ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit 2X SSC bei 50°C) und solchen mit hoher Stringenz (mit 0.2X SSC bei 50°C, bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M Natriumchlorid, pH 7.0).

Darüberhinaus kann die Temperatur während des Waschschrilles von moderaten Bedingungen bei Raumtemperatur, 22°C, bis zu stringenten Bedingungen bei 65°C angehoben werden.

Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt.

Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschrill sind infolge gegeben:

(1) Hybridisierungsbedingungen mit zum Beispiel

(i) 4X SSC bei 65°C, oder

(ii) 6X SSC bei 45°C, oder

(iii) 6X SSC bei 68°C, 100 mg/ml denaturierter Fischsperma-DNA, oder

(iv) 6X SSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA bei 68°C, oder

(v) 6XSSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA, 50 % Formamid bei 42°C, oder

(vi) 50 % Formamid, 4X SSC bei 42°C, oder

5

(vii) 50 % (vol/vol) Formamid, 0.1 % Rinderserumalbumin, 0.1 % Ficoll, 0.1 % Polyvinylpyrrolidon, 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6.5, 750 mM NaCl, 75 mM Natriumcitrat bei 42°C, oder

10 (viii) 2X oder 4X SSC bei 50°C (moderate Bedingungen), oder

(ix) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42° (moderate Bedingungen).

(2) Waschschritte für jeweils 10 Minuten mit zum Beispiel

15

(i) 0.015 M NaCl/0.0015 M Natriumcitrat/0.1 % SDS bei 50°C, oder

(ii) 0.1X SSC bei 65°C, oder

20 (iii) 0.1X SSC, 0.5 % SDS bei 68°C, oder

(iv) 0.1X SSC, 0.5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C, oder

(v) 0.2X SSC, 0.1 % SDS bei 42°C, oder

25

(vi) 2X SSC bei 65°C (moderate Bedingungen).

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren bringt man Nukleinsäuren ein, die eine Ketolase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz

30 SEQ ID NO: 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 60%, vorzugsweise mindestens 65 %, vorzugsweise mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 75 %, bevorzugter mindestens 80 %, bevorzugter mindestens 85 %, bevorzugter mindestens 90 %, bevorzugter mindestens 95 %, besonders bevorzugt mindestens 98 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID  
35 NO: 2 aufweist.

Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die wie vorstehend beschrieben durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz, die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.

Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

Unter Identität zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinelänge verstanden, insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der Vector NTI Suite 7.1 Software der Firma Informax (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Multiple alignment parameter:

Gap opening penalty	10
Gap extension penalty	10
Gap separation penalty range	8
Gap separation penalty	off
% identity for alignment delay	40
Residue specific gaps	off
Hydrophilic residue gap	off
Transition weighing	0

Pairwise alignment parameter:

FAST algorithm on

K-tuple size 1

Gap penalty 3

5 Window size 5

Number of best diagonals 5

10 Unter einer Ketolase, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, wird dementsprechend eine Ketolase verstanden, die bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 2, insbesondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 42 % aufweist.

15 Beispielsweise weist nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz die Sequenz der Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATTC 29133 (SEQ ID NO: 4) mit der Sequenz der Ketolase aus *Nostoc sp. Strain PCC7120* (SEQ ID NO: 2) eine Identität von 65% auf.

20 Die Sequenz der zweiten Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATTC 29133 (SEQ ID NO: 6) weist mit der Sequenz der Ketolase aus *Nostoc sp. Strain PCC7120* (SEQ ID NO: 2) beispielsweise eine Identität von 58% auf.

25 Die Sequenz der Ketolase aus *Synechococcus sp. WH 8102* (SEQ ID NO: 47) weist mit der Sequenz der Ketolase aus *Nostoc sp. Strain PCC7120* (SEQ ID NO: 2) beispielsweise eine Identität von 44% auf.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich:

30 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der Organismus-spezifischen "codon usage" häufig verwendet werden. Die "codon usage" lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

35 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 1, in den Organismus ein.

Alle vorstehend erwähnten Ketolase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann  
5 beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in  
10 Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

Die Sequenz der Ketolase aus *Nostoc sp. Strain PCC7120* (SEQ ID NO: 2) weist mit den Sequenzen der Ketolasen die in den Verfahren des Standes der Technik verwendet werden eine Identität von 39% (*Agrobacterium aurantiacum* (EP 735 137, Accession NO: D58420), 40% (*Alcaligenes sp. PC-1* (EP 735137, Accession NO: D58422) und  
15 20 bis 21 % (*Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille und *Haematococcus pluvialis*; NIES-144 (EP 725137, WO 98/18910 und Lotan et al, FEBS Letters 1995, 364, 125-128, Accession NO: X86782 und D45881) auf.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform werden Organismen kultiviert, die gegenüber dem Wildtyp zusätzlich zur erhöhten Ketolase-Aktivität eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und/oder  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

25 Unter Hydroxylase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Hydroxylase verstanden.

Unter einer Hydroxylase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten,  $\beta$ -ionon-Ring von Carotinoiden eine Hydroxy-Gruppe einzuführen.

30 Insbesondere wird unter einer Hydroxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin oder Canthaxanthin in Astaxanthin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Hydroxylase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin oder Canthaxanthin bzw. gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin verstanden.

5 Bei einer erhöhten Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase die umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin oder Canthaxanthin bzw. die gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin erhöht.

10 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Hydroxylase-Aktivität des Wildtyps.

15 Unter  $\beta$ -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer  $\beta$ -Cyclase verstanden.

Unter einer  $\beta$ -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen  $\beta$ -Ionon-Ring zu überführen.

20 Insbesondere wird unter einer  $\beta$ -Cyclase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\gamma$ -Carotin in  $\beta$ -Carotin umzuwandeln.

25 Dementsprechend wird unter  $\beta$ -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\beta$ -Cyclase umgesetzte Menge  $\gamma$ -Carotin bzw. gebildete Menge  $\beta$ -Carotin verstanden.

30 Bei einer erhöhten  $\beta$ -Cyclase -Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\beta$ -Cyclase die umgesetzte Menge an Lycopin bzw.  $\gamma$ -Carotin oder die gebildete Menge an  $\gamma$ -Carotin aus Lycopin bzw. die gebildete Menge an  $\beta$ -Carotin aus  $\gamma$ -Carotin erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt min-

destens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität des Wildtyps.

5 Die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Organismen und in Wildtyp- bzw. Referenzorganismen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

10 Die Aktivität der Hydroxylase wird nach Bouvier et al. (Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328) *in vitro* bestimmt. Es wird zu einer bestimmten Menge an Organismusextrakt Ferredoxin, Ferredoxin-NADP Oxidoreductase, Katalase, NADPH sowie  $\beta$ -Carotin mit Mono- und Digalaktosylglyzeriden zugegeben.

15 Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, Keller, d'Harlingue und Camara (Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (Capsicum annuum L.; Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328):

20 Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 0.250 ml durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), 0.025 mg Ferredoxin von Spinat, 0.5 Einheiten Ferredoxin-NADP<sup>+</sup> Oxidoreduktase von Spinat, 0.25 mM NADPH, 0.010 mg  $\beta$ -Carotin (in 0.1 mg Tween 80 emulgiert), 0.05 mM einer Mischung von Mono- und Digalaktosylglyzeriden (1:1), 1 Einheit Katalase, 200 Mono- und Digalaktosylglyzeriden (1:1), 0.2 mg Rinderserumalbumin und Organismusextrakt in unterschiedlichem Volumen. Die Reaktionsmischung wird 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Reaktionsprodukte werden mit organischem Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform/Methanol (2:1)  
25 extrahiert und mittels HPLC bestimmt.

30 Die Bestimmung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Organismen und in Wildtyp- bzw. Referenzorganismen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

35 Die Aktivität der  $\beta$ -Cyclase wird nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) *in vitro* bestimmt. Es werden zu einer bestimmten Menge an Organismusextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stromaprotein von Paprika, NADP<sup>+</sup>, NADPH und ATP zugegeben.



Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der  $\beta$ -Cyclase –Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

- 5 Der in-vitro Assay wird in einem Volumen von 250  $\mu$ l Volumen durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Organismusextrakt, 20 nM Lycopin, 250  $\mu$ g an chromoplastidärem Stromaprotein aus Paprika, 0.2 mM NADP<sup>+</sup>, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 10 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium  
10 gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

- Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15).  
15

- Die Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität und/oder  $\beta$ -Cyclase-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression von Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase, und/oder von Nukleinsäuren, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, gegenüber dem Wildtyp.  
20

- Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase, und/oder die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäure, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung des Hydroxylase-Gens und/oder  $\beta$ -Cyclase-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Hydroxylase-Genkopien und/oder  $\beta$ -Cyclase-Genkopien, also durch Einbringen mindestens einer Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, und/oder mindestens einer Nukleinsäure, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, in den Organismus.  
25  
30

- Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase und/oder  $\beta$ -Cyclase, wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Organismus eigenen endogenen Hydroxylase und/oder  $\beta$ -Cyclase verstanden.  
35

Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Hydroxylasen und/oder  $\beta$ -Cyclasen kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

5

Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen Hydroxylase und/oder  $\beta$ -Cyclase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdschubstanzen erfolgen.

10

Des weiteren kann eine veränderte bzw. erhöhte Expression eines endogenen Hydroxylase- und/oder  $\beta$ -Cyclase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein im nicht transformierten Organismus nicht vorkommendes Regulator-Protein mit dem Promotor dieses Gens in Wechselwirkung tritt.

15

Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

20

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, in den Organismus.

25

Dazu kann prinzipiell jedes Hydroxylase-Gen bzw. jedes  $\beta$ -Cyclase-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine Hydroxylase und jede Nukleinsäure, die eine  $\beta$ -Cyclase kodiert, verwendet werden.

30

Bei genomischen Hydroxylase-bzw.  $\beta$ -Cyclase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryotischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall, dass der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende Hydroxylase bzw.  $\beta$ -Cyclase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs, zu verwenden.

35

Ein Beispiel für ein Hydroxylase-Gen ist eine Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, aus *Haematococcus pluvialis*, Accession AX038729, WO 0061764); (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 15, Protein: SEQ ID NO: 16).

- 5 Ein Beispiel für ein  $\beta$ -Cyclase-Gen ist eine Nukleinsäure, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase aus Tomate (Accession X86452). (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 17, Protein: SEQ ID NO: 18).

In den erfindungsgemäßen bevorzugten transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres

- 10 Hydroxylase-Gen und/oder  $\beta$ -Cyclase-Gen vor.

- In dieser bevorzugten Ausführungsform weist der genetisch veränderte Organismus beispielsweise mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase und/oder
- 15 mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, auf.

- Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Hydroxylase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 16 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion
- 20 oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 16, und die die enzymatische Eigenschaft einer Hydroxylase
- 25 aufweisen.

- Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der
- 30 entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID. NO: 16 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 15 aus verschiedenen Organis-

men deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

5 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Hydroxylase der Sequenz SEQ ID NO: 16.

10 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Kodons verwendet, die entsprechend des Organismus-spezifischen "codon usage" häufig verwendet werden. Dieser "codon usage" lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

15 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 15, in den Organismus ein.

20 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als  $\beta$ -Cyclase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 18 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 18, und die die enzymatische Eigenschaft einer  $\beta$ -Cyclase aufweisen.

30 Weitere Beispiele für  $\beta$ -Cyclasen und  $\beta$ -Cyclase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID NO: 18 leicht auffinden.

35 Weitere Beispiele für  $\beta$ -Cyclasen und  $\beta$ -Cyclase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 17 aus verschiedenen Organismen,

deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

5 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der  $\beta$ -Cyclase der Sequenz SEQ. ID. NO: 18.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

10

Bevorzugt werden dafür solche Kodons verwendet, die entsprechend des Organismus-spezifischen "codon usage" häufig verwendet werden. Dieser "codon usage" lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

15

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 17 in den Organismus ein.

20

Alle vorstehend erwähnten Hydroxylase-Gene oder  $\beta$ -Cyclase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die

25

Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

30

Besonders bevorzugt werden im erfindungsgemäßen Verfahren genetisch veränderte Organismen mit folgende Kombinationen genetischer Veränderungen verwendet:

Genetisch veränderte Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

35

genetisch veränderte Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen und

5 genetisch veränderte Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

Die Herstellung dieser genetisch veränderten Organismen kann, wie nachstehend beschrieben, beispielsweise durch Einbringen einzelner Nukleinsäurekonstrukte (Expressionskassetten) oder durch Einbringen von Mehrfachkonstrukten erfolgen, die bis zu  
10 zwei oder drei der beschriebenen Aktivitäten enthalten.

● Unter Organismen werden erfindungsgemäß vorzugsweise Organismen verstanden, die als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen natürlicherweise oder durch genetische Komplementierung und/oder Umregulierung der Stoffwechselwege in der Lage sind,  
15 Carotinoide, insbesondere  $\beta$ -Carotin und/oder Zeaxanthin und/oder Neoxanthin und/oder Violaxanthin und/oder Lutein herzustellen.

Weiter bevorzugte Organismen weisen als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen bereits eine Hydroxylase-Aktivität auf und sind somit als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen in  
20 der Lage, Zeaxanthin herzustellen.

Bevorzugte Organismen sind Pflanzen oder Mikroorganismen, wie beispielsweise Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.

● 25 Als Bakterien können sowohl Bakterien verwendet werden, die aufgrund des Einbringens von Genen der Carotinoidbiosynthese eines Carotinoid-produzierenden Organismus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren, wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Escherichia*, die beispielsweise crt-Gene aus *Erwinia* enthalten, als auch Bakterien, die von sich aus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*,  
30 *Paracoccus*, *Nostoc* oder Cyanobakterien der Gattung *Synechocystis*.

Bevorzugte Bakterien sind *Escherichia coli*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia uredovora*, *Agrobacterium aurantiacum*, *Alcaligenes* sp. PC-1, *Flavobacterium* sp. strain R1534,

das Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803, *Paracoccus marcusii* oder *Paracoccus carotinifaciens*.

Bevorzugte Hefen sind *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia* oder *Phaffia*. Besonders bevorzugte Hefen sind *Xanthophyllomyces dendrorhous* oder *Phaffia rhodozyma*.

Bevorzugte Pilze sind *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Blakeslea*, *Phycomyces*, *Fusarium* oder weitere in Indian Chem. Engr. Section B. Vol. 37, No. 1, 2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze.

Bevorzugte Algen sind Grünalgen, wie beispielsweise Algen der Gattung *Haematococcus*, *Phaedactylum tricornatum*, *Volvox* oder *Dunaliella*. Besonders bevorzugte Algen sind *Haematococcus puvialis* oder *Dunaliella bardawil*.

Weitere brauchbare Mikroorganismen und deren Herstellung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind beispielsweise aus der DE-A-199 16 140 bekannt, worauf hiermit Bezug genommen wird.

Besonders bevorzugte Pflanzen sind Pflanzen ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Iliaceae oder Lamiaceae.

Ganz besonders bevorzugte Pflanzen sind ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen *Marigold*, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Acacia*, *Aconitum*, *Adonis*, *Arnica*, *Aquilegia*, *Aster*, *Astragalus*, *Bignonia*, *Calendula*, *Caltha*, *Campanula*, *Canna*, *Centaurea*, *Cheiranthus*, *Chrysanthemum*, *Citrus*, *Crepis*, *Crocus*, *Curcubita*, *Cytisus*, *Delonia*, *Delphinium*, *Dianthus*, *Dimorphotheca*, *Doronicum*, *Eschscholtzia*, *Forsythia*, *Fremontia*, *Gazania*, *Gelsemium*, *Genista*, *Gentiana*, *Geranium*, *Gerbera*, *Geum*, *Grevillea*, *Helenium*, *Helianthus*, *Hepatica*, *Heracleum*, *Hibiscus*, *Heliopsis*, *Hypericum*, *Hypochoeris*, *Impatiens*, *Iris*, *Jacaranda*, *Kerria*, *Laburnum*, *Lathyrus*, *Leontodon*, *Lilium*, *Linum*, *Lotus*, *Lycopersicon*, *Lysimachia*, *Marattia*, *Medicago*, *Mimulus*, *Narcissus*, *Oenothera*, *Osmanthus*, *Petunia*, *Photinia*, *Physalis*, *Phyteuma*, *Potentilla*, *Pyracantha*,

*Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapsis, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussock, Ulex, Viola* oder *Zinnia*, besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen Marigold, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Lycopersicon*, *Rosa*,  
5 *Calendula*, *Physalis*, *Medicago*, *Helianthus*, *Chrysanthemum*, *Aster*, *Tulipa*, *Narcissus*, *Petunia*, *Geranium*, *Tropaeolum* oder *Adonis*.

Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genetisch veränderten Organismen ein Ernten der  
10 Organismen und weiter bevorzugt zusätzlich ein Isolieren von Ketocarotinoiden aus den Organismen angeschlossen.

Das Ernten der Organismen erfolgt in an sich bekannter Weise dem jeweiligen Organismus entsprechend. Mikroorganismen, wie Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze oder  
15 Pflanzenzellen, die durch Fermentation in flüssigen Nährmedien kultiviert werden, können beispielsweise durch Zentrifugieren, Dekantieren oder Filtrieren abgetrennt werden. Pflanzen werden in an sich bekannter Weise auf Nährböden gezogen und entsprechend geerntet.

Die Kultivierung der genetisch veränderten Mikroorganismen erfolgt bevorzugt in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Kultivierungstemperatur von mindestens etwa 20°C, wie z.B. 20°C bis 40 °C, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9. Bei genetisch veränderten Mikroorganismen erfolgt vorzugsweise zunächst die Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff und in einem Komplexmedium, wie z.B. TB- oder  
25 LB- Medium bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 20 °C oder mehr, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9, bis eine ausreichende Zelldichte erreicht ist. Um die Oxidationsreaktion besser steuern zu können, bevorzugt man die Verwendung eines induzierbaren Promotors. Die Kultivierung wird nach Induktion der Ketolaseexpression in Gegenwart von Sauerstoff, z.B. 12 Stunden bis 3 Tage, fortgesetzt.

Die Isolierung der Ketocarotinoide aus der geernteten Biomasse erfolgt in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Extraktion und gegebenenfalls weiterer chemische oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie Rektifizierverfahren oder physikalische Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie.  
35



Wie nachstehend erwähnt, können die Ketocarotinoide in den erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Pflanzen vorzugsweise in verschiedenen Pflanzengeweben, wie beispielsweise Samen, Blätter, Früchte, Blüten, insbesondere in Blütenblättern spezifisch hergestellt werden.

5

Die Isolierung von Ketocarotinoiden aus den geernteten Blütenblättern erfolgt in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Trocknung und anschließender Extraktion und gegebenenfalls weiterer chemischer oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie

10   Rektifizierverfahren oder physikalische Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie. Die Isolierung von Ketocarotinoiden aus den Blütenblättern erfolgt beispielsweise bevorzugt durch organische Lösungsmittel wie Aceton, Hexan, Ether oder tert.-Methylbutylether.

15   Weitere Isolierverfahren von Ketocarotinoiden, insbesondere aus Blütenblättern, sind beispielsweise in Egger und Kleinig (Phytochemistry (1967) 6, 437-440) und Egger (Phytochemistry (1965) 4, 609-618) beschrieben.

20   Vorzugsweise sind die Ketocarotinoide ausgewählt aus der Gruppe Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin.

Ein besonders bevorzugtes Ketocarotinoid ist Astaxanthin.

25   Je nach verwendetem Organismus fallen die Ketocarotinoide in freier Form oder als Fettsäureester an.

In Blütenblättern von Pflanzen fallen die Ketocarotinide im erfindungsgemäßen Verfahren in Form ihrer Mono- oder Diester mit Fettsäuren an. Einige nachgewiesene Fettsäuren sind z.B. Myristinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure, Linolensäure, und Laurinsäure (Kamata und Simpson (1987) Comp. Biochem. Physiol. Vol. 86B(3), 587-591).

30

Die Herstellung der Ketocarotinoide kann in der ganzen Pflanze oder in einer bevorzugten Ausführungsform spezifisch in Pflanzengeweben, die Chromoplasten enthalten, erfolgen. Bevorzugte Pflanzengewebe sind beispielsweise Wurzeln, Samen, Blätter,

35

Früchte, Blüten und insbesondere Nektarien und Blütenblätter, die auch Petalen bezeichnet werden.

5 In einer besonderen bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Blüten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

10 Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt funktionell verknüpft mit einem blütenspezifischen Promotor in die Pflanze eingebracht.

15 In einer weiteren, besonderes bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Früchten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

20 Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines fruchtspezifischen Promotors erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt funktionell verknüpft mit einem fruchtspezifischen Promotor in die Pflanze eingebracht.

25 In einer weiteren, besonderes bevorzugten, Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Samen die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

30 Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt funktionell verknüpft mit einem samenspezifischen Promotor in die Pflanze eingebracht.

35 Das Targeting in die Chromoplasten erfolgt durch ein funktionell verknüpftes plastidäres Transitpeptid.

Im folgenden wird exemplarisch die Herstellung genetisch veränderter Pflanzen mit erhöhter oder verursachter Ketolase-Aktivität beschrieben. Die Erhöhung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise der Hydroxylase-Aktivität und/oder der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität kann analog unter Verwendung von Nukleinsäuresequenzen, kodierend eine Hydroxylase bzw.  $\beta$ -Cyclase anstelle von Nukleinsäuresequenzen, kodierend eine Ketolase, erfolgen. Die Transformation kann bei den Kombinationen von genetischen Veränderungen einzeln oder durch Mehrfachkonstrukte erfolgen.

Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt vorzugsweise durch Transformation der Ausgangspflanzen, mit einem Nukleinsäurekonstrukt, das die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase enthält, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

Diese Nukleinsäurekonstrukte, in denen die kodierende Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten, werden im folgenden auch Expressionskassetten genannt.

Vorzugsweise enthalten die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, das jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Vektoren für Pflanzen und Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen, sowie die transgenen Pflanzen selbst beschrieben.

- 5 Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten, aber nicht darauf beschränkten Sequenzen, sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärkern wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus  
10 (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

Als Promotor der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann.

- 15 "Konstitutiver" Promotor meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten.

- Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen  
20 Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221-228), der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202), den Triose-  
25 Phosphat Translokator (TPT) Promotor aus *Arabidopsis thaliana* Acc.-No. AB006698 , Basenpaar 53242 bis 55281; das Gen beginnend ab bp 55282 ist mit "phosphate/triose-phosphate translocator" annotiert, oder den 34S Promoter aus Figwort mosaic virus Acc.-No. X16673, Basenpaar 1 bis 554.

- 30 Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der pds Promoter (Pecker et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89: 4962-4966) oder der "Rubisco small subunit (SSU)"-Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus *Agrobacterium*, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus *Agrobacterium*, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), der Ubiquitin 1 Pro-  
35 motor (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc

Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), der Smas Promotor, der Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), der Pnit-Promoter (Y07648.L, Hillebrand et al. (1998), Plant. Mol. Biol. 36, 89-99, Hillebrand et al. (1996), Gene, 170, 197-200) sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist.

Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die Expression des Ketolase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), ein durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden.

Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), der licht-induzierbare PPDK Promotor oder der verwundungsinduzierte pinII-Promoter (EP375091).

Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, b-1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknes, et al. (1992) The Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Viral 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genet 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968(1989).

Umfasst sind auch verwundungsinduzierbare Promotoren wie der des pinII-Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin-Gens (McGurl et al. (1992)

- 5 Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Ekelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) The Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.

- 10 Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise fruchtreifung-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

- 15 Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Ketocarotinoiden bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Bevorzugt sind beispielsweise Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Petalen, Sepalen, Blüten, Blätter, Stengel, Samen und Wurzeln und Kombinationen hieraus.

- 20 Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren sind beispielsweise der Patatin-Promotor Klasse I (B33) oder der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.

- 25 Blattspezifische Promotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EMBO J 8:2445-2451).

- 30 Blütenspezifische Promotoren sind beispielsweise der Phytoen-Synthase Promotor (WO 92/16635) oder der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593), der AP3 Promoter aus Arabidopsis thaliana (siehe Beispiel 5), der CHRC-Promoter (Chromoplast-specific carotenoid-associated protein (CHRC) gene promoter aus Cucumis sativus Acc.-No. AF099501, Basenpaar 1 bis 1532), der EPSP\_Synthase Promotor (5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene promoter aus Petunia hybrida, Acc.-No. M37029, Basenpaar 1 bis 1788), der PDS Promotor (Phytoene desaturase gene pro-
- 35

moter aus *Solanum lycopersicum*, Acc.-No. U46919, Basenpaar 1 bis 2078), der DFR-A Promotor (Dihydroflavonol 4-reductase gene A promoter aus *Petunia hybrida*, Acc.-No. X79723, Basenpaar 32 bis 1902) oder der FBP1 Promotor (Floral Binding Protein 1 gene promoter aus *Petunia hybrida*, Acc.-No. L10115, Basenpaar 52 bis 1069).

5

Antheren-spezifische Promotoren sind beispielsweise der 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), der glob-I Promotor oder der g-Zein Promotor.

10

Samen-spezifische Promotoren sind beispielsweise der ACP05-Promotor (Acyl-carrier-Protein Gen, WO9218634), die Promotoren AtS1 und AtS3 von *Arabidopsis* (WO 9920775), der LeB4-Promotor von *Vicia faba* (WO 9729200 und US 06403371), der Napin-Promotor von *Brassica napus* (US 5608152; EP 255378; US 5420034), der SBP-Promotor von *Vicia faba* (DE 9903432) oder die Maispromotoren End1 und End2 (WO 0011177).

15

Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben in Rogers et al. (1987) Meth in Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11 und Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

20

Besonders bevorzugt im erfindungsgemäßen Verfahren sind konstitutive, samenspezifische, fruchtspezifische, blütenspezifische und insbesondere blütenblattspezifische Promotoren.

25

Die vorliegende Erfindung betrifft daher insbesondere ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen blütenspezifischen oder insbesondere einen blütenblattspezifischen Promotor und eine Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

30

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer vorstehend beschriebenen Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, und vorzugsweise einer zwischen Promotor und Nukleinsäure-Sequenz inserierten Nukleinsäure, die für ein plastidenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie

35

einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular

Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987), beschrieben sind.

Die vorzugsweise insertierte Nukleinsäuren, kodierend ein plastidäres Transitpeptid, gewährleisten die Lokalisation in Plastiden und insbesondere in Chromoplasten.

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren Nukleinsäure-Sequenz für ein Ketolase-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chromoplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation der Ketolase in die Chromoplasten vom Ketolase-Teil enzymatisch abgespalten werden.

Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären *Nicotiana tabacum* Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco (rbcS) oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als auch der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem Äquivalent abgeleitet ist.

Besonders bevorzugt sind Nukleinsäure-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

pTP09

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTC  
GTTCTGTCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCT-  
CACTTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCCG-  
TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCGTCTCGTAAGGTCACCGGC-  
GATTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAACTGAGACTGCGG-  
GATCC\_BamHI

pTP10



KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTC  
 GTTCTGTCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCT-  
 CACTTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACACCTCCCGCCGCCG-  
 TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCGTTCGTAAGGTCACCGGC-  
 5 GATTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCAGCTG-  
 GATCC\_BamHI

pTP11

10 KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTC  
 GTTCTGTCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCT-  
 CACTTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACACCTCCCGCCGCCG-  
 TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCGTTCGTAAGGTCACCGGC-  
 GATTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCAGG-  
 15 GATCC\_BamHI

Weitere Beispiele für ein plastidäres Transitpeptid sind das Transitpeptid der plastidären Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) aus *Arabidopsis thaliana* und das Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Ribulosebisphosphat Carboxylase (rbcS) aus  
 20 Erbse (Guerineau, F, Woolston, S, Brooks, L, Mullineaux, P (1988) An expression cassette for targeting foreign proteins into the chloroplasts. Nucl. Acids Res. 16: 11380).

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-  
 5 Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen.

Bevorzugt sind, wie vorstehend beschrieben, synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons  
 30 können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden.

Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise  
 35 in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist.

Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptern oder Linker angesetzt werden.

5 Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann so-  
10 wohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet vorzugsweise in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine kodierende Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäurekonstrukt und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

15 Beispiele für einen Terminator sind der 35S-Terminator (Guerineau et al. (1988) Nucl Acids Res. 16: 11380), der nos Terminator (Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. J Mol Appl Genet. 1982;1(6):561-73) oder der ocs Terminator (Gielen, J, de Beuckeleer, M, Seurinck, J, Debroek, H, de Greve, H, Lemmers, M, van Montagu, M, Schell, J (1984) The complete sequence of the TL-DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiAch5. EMBO J. 3: 835-846).

25 Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primer-repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.

30 Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

35 Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-

Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet.

Dazu können an sich bekannte Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt werden.

Geeignete Methoden zur Transformation von Pflanzen sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone – die sogenannte "particle bombardment" Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der, vorstehend beschriebene, durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225) beschrieben.

Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711) oder besonders bevorzugt pSUN2, pSUN3, pSUN4 oder pSUN5 (WO 02/00900).

Mit einem Expressionsplasmid transformierte Agrobakterien können in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Zur bevorzugten Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, wird die fusionierte Expressionskassette, die eine Ketolase exprimiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19 oder insbesondere pSUN5 und pSUN3 kloniert, der geeignet ist, in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert zu werden. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen ver-

wendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

- 5 Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein
- 10 in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthalten.
- Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine Ketolase kodierenden Nukleinsäure wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71-119 (1993) beschrieben.
- 15
- 20 Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pJIT117 (Guerineau et al. (1988) Nucl. Acids Res.16 :11380), pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl
- 25 in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

Im folgenden wird die Herstellung der erfindungsgemäßen gentisch veränderten Mikroorganismen näher beschrieben:

- 30 Die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase oder  $\beta$ -Hydroxylase oder  $\beta$ -Cyclase sind vorzugsweise in Expressionskonstrukte eingebaut, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine für ein erfindungsgemäßes Enzym kodierende Nukleinsäuresequenz; sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte.

Vorzugsweise umfassen solche erfindungsgemäßen Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der kodierenden Sequenz. Unter einer "operativen Verknüpfung" versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

- 5      Beispiele für operativ verknüpfbare Sequenzen sind Targeting-Sequenzen sowie Translationsverstärker, Enhancer, Polyadenylierungssignale und dergleichen. Weitere regulative Elemente umfassen selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und dergleichen.
- 10      Zusätzlich zu den artifiziellen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulationssequenz vor dem eigentlichen Strukturgen noch vorhanden sein. Durch genetische Veränderung kann diese natürliche Regulation gegebenenfalls ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht oder erniedrigt werden. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es werden keine zusätzlichen Regulationssignale
- 15      vor das Strukturgen insertiert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Statt dessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert oder verringert wird. Die Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt
- 20      enthalten sein.

25

- Beispiele für brauchbare Promotoren in Mikroorganismen sind: cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, lambda-PR- oder im lambda-PL-Promotor, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden; sowie die gram-positiven Promotoren amy und SPO2 oder die Hefepromotoren
- 30      ADC1, MFa, AC, P-60, CYC1, GAPDH. Besonders bevorzugt ist die Verwendung induzierbarer Promotoren, wie z.B. licht- und insbesondere temperaturinduzierbarer Promotoren, wie der P<sub>7</sub>P<sub>1</sub>-Promotor.

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen verwendet werden. Darüber hinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

- 5 Die genannten regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Nukleinsäuresequenzen und die Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.
- 10 Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen oder erniedrigen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.
- 15

- Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, kodierend eine Ketolase,  $\beta$ -Hydroxylase oder  $\beta$ -Cyclase sowie einem Terminator- oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.
- 20
- 25

- Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor insertiert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannte Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre
- 30
- 35

DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.

Als Beispiele für geeignete Expressionsvektoren können genannt werden:

5

Übliche Fusionsexpressionsvektoren, wie pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. und Johnson, K.S. (1988) *Gene* 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) und pRIT 5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), bei denen Glutathion-S-Transferase (GST), Maltose E-bindendes Protein bzw. Protein A an das rekombinante Zielprotein fusioniert wird.

10

15

Nicht-Fusionsprotein-Expressionsvektoren wie pTrc (Amann et al., (1988) *Gene* 69:301-315) und pET 11d (Studier et al. *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60-89) oder pBluescript und pUC-Vektoren.

20

Hefe-Expressionsvektor zur Expression in der Hefe *S. cerevisiae*, wie pYepSec1 (Baldari et al., (1987) *Embo J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan und Herskowitz (1982) *Céll* 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) *Gene* 54:113-123) sowie pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA).

25

Vektoren und Verfahren zur Konstruktion von Vektoren, die sich zur Verwendung in anderen Pilzen, wie filamentösen Pilzen, eignen, umfassen diejenigen, die eingehend beschrieben sind in: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, J.F. Peberdy et al., Hrsg., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.

30

Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von Proteinen in gezüchteten Insektenzellen (bspw. Sf9-Zellen) verfügbar sind, umfassen die pAc-Reihe (Smith et al., (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) und die pVL-Reihe (Lucklow und Summers (1989) *Virology* 170:31-39).

35

Weitere geeignete Expressionssysteme für prokaryontische und eukaryotische Zellen sind in Kapitel 16 und 17 von Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T., *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 beschrieben.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Expressionskonstrukte bzw. Vektoren sind genetisch veränderte Mikroorganismen herstellbar, welche beispielsweise mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert sind.

5      Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen erfindungsgemäßen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden, wie beispielsweise Co-Präzipitation, Protoplastenfusion, Elektroporation, retrovirale Transfektion und dergleichen, verwendet, um die genannten Nukleinsäuren  
10      im jeweiligen Expressionssystem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, beschrieben.

15      Die Selektion erfolgreich transformierter Organismen kann durch Markergene erfolgen, die ebenfalls im Vektor oder in der Expressionskassette enthalten sind. Beispiele für solche Markergene sind Gene für Antibiotikaresistenz und für Enzyme, die eine farbgebende Reaktion katalysieren, die ein Anfärben der transformierten Zelle bewirkt. Diese können dann mittels automatischer Zellsortierung selektiert werden.

20      Erfolgreich mit einem Vektor transformierte Mikroorganismen, die ein entsprechendes Antibiotikaresistenzgen (z.B. G418 oder Hygromycin) tragen, lassen sich durch entsprechende Antibiotika-enhaltende Medien oder Nährböden selektieren. Markerproteine, die an der Zelloberfläche präsentiert werden, können zur Selektion mittels Affinitätschromatographie genutzt werden.

25      Die Kombination aus den Wirtsorganismen und den zu den Organismen passenden Vektoren, wie Plasmide, Viren oder Phagen, wie beispielsweise Plasmide mit dem RNA-Polymerase/Promoter-System, die Phagen 8 oder andere temperente Phagen oder Transposons und/oder weiteren vorteilhaften regulatorischen Sequenzen bildet  
30      ein Expressionssystem.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Organismen, dadurch gekennzeichnet, das man ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen Promotor und Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, ent-  
35      haltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine



Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, und gegebenenfalls einen Terminator in das Genom des Ausgangsorganismus oder extrachromosomal in den Ausgangsorganismus einführt.

- 5 Die Erfindung betrifft ferner die genetisch veränderten Organismen, wobei die genetische Veränderung die Aktivität einer Ketolase

A für den Fall, dass der Wildtyporganismus bereits eine Ketolase-Aktivität aufweist, gegenüber dem Wildtyp erhöht und

10

B für den Fall, dass der Wildtyporganismus keine Ketolase-Aktivität aufweist, gegenüber dem Wildtyp verursacht

- 15 und die nach A erhöhte oder nach B verursachte Ketolase-Aktivität durch eine Ketolase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

- 20 Wie vorstehend ausgeführt erfolgt die Erhöhung oder Verursachung der Ketolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp vorzugsweise durch eine Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von
- 25 mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

- In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt, wie vorstehend ausgeführt, die Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, durch Einbringen von Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, in die Pflanzen und damit vorzugsweise durch Überexpression oder transgene Expression von
- 30 Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

35

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Organismus, enthaltend mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist. Dies ist der Fall, wenn der Ausgangsorganismus keine Ketolase oder eine endogen Ketolase aufweist und eine transgene Ketolase überexprimiert wird.

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Organismus, enthaltend mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist. Dies ist der Fall, wenn der Ausgangsorganismus eine endogen Ketolase aufweist und die endogene Ketolase überexprimiert wird.

Besonders bevorzugte, genetisch veränderte Organismen weisen, wie vorstehend erwähnt, zusätzlich eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und/oder  $\beta$ -Cyclase-Aktivität gegenüber einem Wildtyporganismus auf. Weiter bevorzugte Ausführungsformen sind vorstehend im erfindungsgemäßen Verfahren beschrieben.

Unter Organismen werden erfindungsgemäß vorzugsweise Organismen verstanden, die als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen natürlicherweise oder durch genetische Komplementierung und/oder Umregulierung der Stoffwechselwege in der Lage sind, Carotinoide, insbesondere  $\beta$ -Carotin und/oder Zeaxanthin und/oder Neoxanthin und/oder Violaxanthin und/oder Lutein herzustellen.

Weiter bevorzugte Organismen weisen als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen bereits eine Hydroxylase-Aktivität auf und sind somit als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen in der Lage, Zeaxanthin herzustellen.

Bevorzugte Organismen sind Pflanzen oder Mikroorganismen, wie beispielsweise Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.

Als Bakterien können sowohl Bakterien verwendet werden, die aufgrund des Einbringens von Genen der Carotinoidbiosynthese eines Carotinoid-produzierenden Organis-

mus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren, wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Escherichia*, die beispielsweise crt-Gene aus *Erwinia* enthalten, als auch Bakterien, die von sich aus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*,

5 *Paracoccus*, *Nostoc* oder Cyanobakterien der Gattung *Synechocystis*.

Bevorzugte Bakterien sind *Escherichia coli*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia uredovora*, *Agrobacterium aurantiacum*, *Alcaligenes* sp. PC-1, *Flavobacterium* sp. strain R1534, das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803, *Paracoccus marcusii* oder *Paracoccus carotinifaciens*.

10

Bevorzugte Hefen sind *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia* oder *Phaffia*. Besonders bevorzugte Hefen sind *Xanthophyllomyces dendrorhous* oder *Phaffia rhodozyma*.

15

Bevorzugte Pilze sind *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Blakeslea*, *Phycomyces*, *Fusarium* oder weitere in Indian Chem. Engr. Section B. Vol. 37, No. 1, 2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze.

20

Bevorzugte Algen sind Grünalgen, wie beispielsweise Algen der Gattung *Haematococcus*, *Phaedactylum tricornatum*, *Volvox* oder *Dunaliella*. Besonders bevorzugte Algen sind *Haematococcus puvialis* oder *Dunaliella bardawil*.

Weitere brauchbare Mikroorganismen und deren Herstellung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind beispielsweise aus der DE-A-199 16 140 bekannt, worauf hiermit Bezug genommen wird.

Besonders bevorzugte Pflanzen sind Pflanzen ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Lina-  
 30 ceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Iliaceae oder Lamiaceae.

35

Ganz besonders bevorzugte Pflanzen sind ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen *Marigold*, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Acacia*, *Aconitum*, *Adonis*, *Arni-*

ca, *Aquilegia*, *Aster*, *Astragalus*, *Bignonia*, *Calendula*, *Caltha*, *Campanula*, *Canna*,  
*Centaurea*, *Cheiranthus*, *Chrysanthemum*, *Citrus*, *Crepis*, *Crocus*, *Curcubita*, *Cytisus*,  
*Delonia*, *Delphinium*, *Dianthus*, *Dimorphotheca*, *Doronicum*, *Eschscholtzia*, *Forsythia*,  
5 *Fremontia*, *Gazania*, *Gelsemium*, *Genista*, *Gentiana*, *Geranium*, *Gerbera*, *Geum*, *Grevillea*, *Helenium*, *Helianthus*, *Hepatica*, *Heracleum*, *Hibiscus*, *Heliopsis*, *Hypericum*,  
*Hypochoeris*, *Impatiens*, *Iris*, *Jacaranda*, *Kerria*, *Laburnum*, *Lathyrus*, *Leontodon*, *Lilium*, *Linum*, *Lotus*, *Lycopersicon*, *Lysimachia*, *Marattia*, *Medicago*, *Mimulus*, *Narcissus*,  
*Oenothera*, *Osmanthus*, *Petunia*, *Photinia*, *Physalis*, *Phyteuma*, *Potentilla*, *Pyracantha*,  
10 *Ranunculus*, *Rhododendron*, *Rosa*, *Rudbeckia*, *Senecio*, *Silene*, *Silphium*, *Sinapsis*,  
*Sorbus*, *Spartium*, *Tecoma*, *Torenia*, *Tragopogon*, *Trollius*, *Tropaeolum*, *Tulipa*, *Tussilago*, *Ulex*, *Viola* oder *Zinnia*, besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe der  
Pflanzengattungen Marigold, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Lycopersicon*, *Rosa*,  
*Calendula*, *Physalis*, *Medicago*, *Helianthus*, *Chrysanthemum*, *Aster*, *Tulipa*, *Narcissus*,  
*Petunia*, *Geranium*, *Tropaeolum* oder *Adonis*.

15 Ganz besonders bevorzugte genetisch veränderte Pflanzen sind ausgewählt aus den  
Pflanzengattungen Marigold, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Adonis*, *Lycopersicon*,  
*Rosa*, *Calendula*, *Physalis*, *Medicago*, *Helianthus*, *Chrysanthemum*, *Aster*, *Tulipa*, *Narcissus*,  
*Petunia*, *Geranium* oder *Tropaeolum*, wobei die genetisch veränderte Pflanze  
20 mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthält.

Die transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -  
gewebe oder -teile, insbesondere deren Früchte, Samen, Blüten und Blütenblätter  
sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

25 Die genetisch veränderten Pflanzen können, wie vorstehend beschrieben, zur Herstellung  
von Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin verwendet werden.

30 Von Menschen und Tieren verzehrbare erfindungsgemäße, genetisch veränderte Organismen,  
insbesondere Pflanzen oder Pflanzenteile, wie insbesondere Blütenblätter  
mit erhöhtem Gehalt an Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin können auch bei-  
spielsweise direkt oder nach an sich bekannter Prozessierung als Nahrungsmittel oder  
Futtermittel oder als Futter- und Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden.

Ferner können die genetisch veränderten Organismen zur Herstellung von Ketocarotinoid-haltigen Extrakten der Organismen und/oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungsergänzungsmitteln verwendet werden.

- 5 Die genetisch veränderten Organismen weisen im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden auf.

Unter einem erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden wird in der Regel ein erhöhter Gehalt an Gesamt-Ketocarotinoid verstanden.

10

Unter einem erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden wird aber auch insbesondere ein veränderter Gehalt der bevorzugten Ketocarotinoide verstanden, ohne dass zwangsläufig der Gesamt-Carotinoidgehalt erhöht sein muss.

- 15 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Astaxanthin auf.

- 20 Unter einem erhöhten Gehalt wird in diesem Fall auch ein verursachter Gehalt an Ketocarotinoiden, bzw. Astaxanthin verstanden.

Die Erfindung betrifft ferner die neuen Ketolasen sowie die neuen Nukleinsäuren, die diese kodieren.

- 25 Insbesondere betrifft die Erfindung Ketolasen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 8 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Amino-
- 30 säureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 8 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 4 nicht enthalten ist. Die Sequenz SEQ ID NO: 4 ist, wie vorstehend erwähnt, als putatives Protein in Datenbanken annotiert.

- 35 Ferner betrifft die Erfindung Ketolasen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 % auf Amino-

säureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 6 aufweist. Die Sequenz SEQ ID NO: 6 ist, wie vorstehend erwähnt, in Datenbanken nicht annotiert.

5 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Ketolasen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 12 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 12 aufweist, mit der  
10 Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 6 nicht enthalten ist.

● Ferner betrifft die Erfindung Ketolasen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 49 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50 %, vorzugsweise mindestens 60%, besonders bevorzugt mindestens 70%, bevorzugter mindestens 80%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 49 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 47 nicht enthalten ist. Die Sequenz SEQ ID NO: 47 ist, wie vorstehend erwähnt, als putatives Protein in Datenbanken annotiert.

20 Die Erfindung betrifft ferner Nukleinsäuren, kodierend ein vorstehend beschriebenes Protein, mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure nicht die Sequenz SEQ ID NO: 5 enthält.

● 25 Überraschenderweise wurde gefunden, dass ein Protein enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 4 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, eine Eigenschaft als Ketolase aufweist.

35 Die Erfindung betrifft daher auch die Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens

80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 4 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.

- 5 Ferner wurde überraschenderweise gefunden, dass ein Protein enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 65%, vorzugsweise mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 6 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, eine Eigenschaft als Ketolase aufweist.

- 15 Die Erfindung betrifft daher auch die Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 65%, vorzugsweise mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 6 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.

- 20 Ferner wurde überraschenderweise gefunden, dass ein Protein enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 47 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 60 %, vorzugsweise mindestens 70%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 47 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, eine Eigenschaft als Ketolase aufweist.

- 30 Die Erfindung betrifft daher auch die Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 47 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 60 %, vorzugsweise mindestens 70%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter
- 35

mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 47 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.

- 5 Im Vergleich zu den Verfahren des Standes der Technik, liefert das erfindungsgemäße Verfahren eine höhere Menge an Ketocarotinoide, insbesondere Astaxanthin mit einer geringeren Menge an hydroxylierten Nebenprodukten.

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

10

Allgemeine Experimentelle Bedingungen:  
Sequenzanalyse rekombinanter DNA

15

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).

Beispiel 1:

20

Amplifikation einer DNA, die die gesamte Primärsequenz der NOST-Ketolase aus *Nostoc sp. PCC 7120* codiert

Die DNA, die für die NOST-Ketolase aus *Nostoc sp. PCC 7120* kodiert, wurde mittels PCR aus *Nostoc sp. PCC 7120* (Stamm der "Pasteur Culture Collection of Cyanobacterium") amplifiziert.

25

30

Für die Präparation von genomischer DNA aus einer Suspensionskultur von *Nostoc sp. PCC 7120*, die 1 Woche mit Dauerlicht und konstantem Schütteln (150 rpm) at 25°C in BG 11-Medium (1.5 g/l NaNO<sub>3</sub>, 0.04 g/l K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 0.075 g/l MgSO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O, 0.036 g/l CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.006 g/l citric acid, 0.006 g/l Ferric ammonium citrate, 0.001 g/l EDTA disodium magnesium, 0.04 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1ml trace metal mix A5+Co (2.86 g/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.81 g/l MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.222 g/l ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.39 g/l NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.079 g/l CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.0494 g/l Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) gewachsen war, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert.

35



Protokoll für DNA Isolation aus *Nostoc PCC7120*:

Aus einer 10 ml Flüssigkultur wurden die Bakterienzellen durch 10minütige Zentrifugation bei 8 000 rpm pelletiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen in flüssigem

- 5 Stickstoff mit einem Mörser zerstoßen und gemahlen. Das Zellmaterial wurde in 1 ml 10mM Tris HCl (pH 7.5) resuspendiert und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß (2ml Volumen) überführt. Nach Zugabe von 100 µl Proteinase K (Konzentration: 20 mg/ml) wurde die Zellsuspension für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 500 µl Phenol extrahiert. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 13 000  
10 upm wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 2 ml-Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion mit Phenol wurde 3mal wiederholt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 0.6 Volumen Isopropanol gefällt und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in 25 µl Wasser aufgenommen und unter Erhitzung auf 65°C  
15 gelöst.

- Die Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase aus *Nostoc PCC 7120*, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) aus *Nostoc sp. PCC 7120* unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (NOSTF, SEQ ID No. 19) und eines antisense-spezifischen Primers (NOSTG SEQ ID No. 20) amplifiziert.
- 20

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 35
- 1 µl einer *Nostoc sp. PCC 7120* DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
  - 0.25 mM dNTPs
  - 30 - 0.2 mM NOSTF (SEQ ID No. 19)
  - 0.2 mM NOSTG (SEQ ID No. 20)
  - 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
  - 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
  - 25.8 µl Aq. Dest.

35 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94°C 2 Minuten

35X 94°C 1 Minute

55°C 1 Minuten

5 72°C 3 Minuten

1X 72°C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 19 und SEQ ID No. 20 resultierte in einem 805 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (SEQ ID No. 21). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-T (Promega) kloniert und der Klon pNOSTF-G erhalten.

Sequenzierung des Klons pNOSTF-G mit dem M13F- und dem M13R-Primer bestätigte eine Sequenz, welche mit der DNA-Sequenz von 88,886-89,662 des Datenbankeintrages AP003592 identisch ist. Diese Nukleotidsequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Nostoc sp. PCC 7120*.

Dieser Klon pNOSTF-G wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 799 Bp SphI-Fragmentes aus pNOSTF-G und Ligierung in den SphI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die Ketolase von *Nostoc sp. PCC 7120* in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJNOST.

#### Beispiel 2:

Konstruktion des Plasmides pMCL-CrtYIBZ/idi/gps für die Synthese von Zeaxanthin in *E. coli*

Die Konstruktion von pMCL-CrtYIBZ/idi/gps erfolgte in drei Schritten über die Zwischenstufen pMCL-CrtYIBZ und pMCL-CrtYIBZ/idi. Als Vektor wurde das mit high-copy-number Vektoren kompatible Plasmid pMCL200 verwendet (Nakano, Y., Yoshida, Y., Yamashita, Y. und Koga, T.; Construction of a series of pACYC-derived plasmid vectors; Gene 162 (1995), 157-158).

## Beispiel 2.1.: Konstruktion von pMCL-CrtYIBZ

Die Biosynthesegene *crtY*, *crtB*, *crtI* und *crtZ* entstammen dem Bakterium *Erwinia uredovora* und wurden mittels PCR amplifiziert. Genomische DNA von *Erwinia uredovora* (DSM 30080) wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) innerhalb eines Service-Dienstes präpariert. Die PCR-Reaktion wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt (Roche, Long Template PCR: Procedure for amplification of 5-20 kb targets with the expand long template PCR system). Die PCR-Bedingungen für die Amplifikation des Biosynthesecusters von *Erwinia uredovora* waren die folgenden:

## Master Mix 1:

- 1.75  $\mu$ l dNTPs (Endkonzentration 350  $\mu$ M)
  - 0.3  $\mu$ M Primer Crt1 (SEQ ID No. 22)
  - 0.3  $\mu$ M Primer Crt2 (SEQ ID No. 23)
  - 250 – 500 ng genomische DNA von DSM 30080
- Aq. Dest. bis zu einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l

## Master Mix 2:

- 5  $\mu$ l 10x PCR Puffer 1 (Endkonzentration 1x, mit 1.75 mM Mg<sup>2+</sup>)
  - 10x PCR Puffer 2 (Endkonzentration 1x, mit 2.25 mM Mg<sup>2+</sup>)
  - 10x PCR Puffer 3 (Endkonzentration 1x, mit 2.25 mM Mg<sup>2+</sup>)
  - 0.75  $\mu$ l Expand Long Template Enzyme Mix (Endkonzentration 2.6 Units)
- Aq. Dest. bis zu einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l

Die beiden Ansätze "Master Mix 1" und "Master Mix 2" wurden zusammenpipetiert. Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- |     |      |             |
|-----|------|-------------|
| 1X  | 94°C | 2 Minuten   |
| 30X | 94°C | 30 Sekunden |
|     | 58°C | 1 Minute    |
|     | 68°C | 4 Minuten   |
| 1X  | 72°C | 10 Minuten  |

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 22 und SEQ ID No. 23 resultierte in einem Fragment (SEQ ID NO: 24), das für die Gene *CrtY* (Protein: SEQ ID NO: 25), *CrtI* (Protein: SEQ ID NO: 26), *crtB* (Protein: SEQ ID NO: 27) und *CrtZ* (*idNA*) kodiert. Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-

5 Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und der Klon pCR2.1-CrtYIBZ erhalten.

Das Plasmid pCR2.1-CrtYIBZ wurde Sall und HindIII geschnitten, das resultierende Sall/HindIII-Fragment isoliert und durch Ligierung in den Sall/HindIII geschnittenen Vektor pMCL200 transferiert. Das in pMCL 200 klonierte Sall/HindIII Fragment aus  
10 pCR2.1-CrtYIBZ ist 4624 Bp lang, kodiert für die Gene *CrtY*, *CrtI*, *crtB* und *CrtZ* und entspricht der Sequenz von Position 2295 bis 6918 in D90087 (SEQ ID No. 24). Der resultierende Klon heisst pMCL-CrtYIBZ.

Beispiel 2.2.: Konstruktion von pMCL-CrtYIBZ/*idi*

15 Das Gen *idi* (Isopentenylidiphosphat-Isomerase; IPP-Isomerase) wurde aus *E. coli* mittels PCR amplifiziert. Die Nukleinsäure, kodierend das gesamte *idi* Gen mit *idi*-Promotor und Ribosomenbindestelle, wurde aus *E. coli* mittels "polymerase chain reaction" (PCR) unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (5'-*idi* SEQ ID No. 28) und eines antisense-spezifischen Primers (3'-*idi* SEQ ID No. 29) amplifiziert.

20

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

5

- 1 µl einer *E. coli* TOP10- Suspension
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM 5'-*idi* (SEQ ID No. 28)
- 0.2 mM 3'-*idi* (SEQ ID No. 29)
- 30 - 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

35

- 1X 94°C 2 Minuten  
 20X 94°C 1 Minute  
     62 °C 1 Minute  
     72°C 1 Minute  
 5 1X 72°C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 28 und SEQ ID No. 29 resultierte in einem 679 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (SEQ ID No. 30). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und der Klon pCR2.1-idi erhalten.

Sequenzierung des Klons pCR2.1-idi bestätigte eine Sequenz, die sich nicht von der publizierten Sequenz AE000372 in Position 8774 bis Position 9440 unterscheidet. Diese Region umfaßt die Promotor-Region, die potentielle Ribosomenbindestelle und den gesamten "open reading frame" für die IPP-Isomerase. Das in pCR2.1-idi klonierte Fragment hat durch das Einfügen einer XhoI-Schnittstelle am 5'-Ende und einer Sall-Schnittstelle am 3'-Ende des *idi*-Gens eine Gesamtlänge von 679 Bp.

Dieser Klon wurde daher für die Klonierung des *idi*-Gens in den Vektor pMCL-CrtYIBZ verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des XhoI/Sall-Fragmentes aus pCR2.1-idi und Ligierung in den XhoI/Sall geschnittenen Vektor pMCL-CrtYIBZ. Der resultierende Klon heisst pMCL-CrtYIBZ/*idi*.

Beispiel 2.3.: Konstruktion von pMCL-CrtYIBZ/*idi*/*gps*  
 Das Gen *gps* (Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase; ; GGPP-Synthase) wurde aus *Archaeoglobus fulgidus* mittels PCR amplifiziert. Die Nukleinsäure, kodierend *gps* aus *Archaeoglobus fulgidus*, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (5'-*gps* SEQ ID No. 32) und eines anti-sense-spezifischen Primers (3'-*gps* SEQ ID No. 33) amplifiziert.

Die DNA von *Archaeoglobus fulgidus* wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) innerhalb eines Service-Dienstes präpariert. Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein GGPP-Synthase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 5 - 1 µl einer *Archaeoglobus fulgidus*-DNA
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM 5'-gps (SEQ ID No. 32)
- 0.2 mM 3'-gps (SEQ ID No. 33)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 10 - 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 15 1X 94°C 2 Minuten
- 20X 94°C 1 Minute
- 56°C 1 Minute
- 72°C 1 Minute
- 1X 72°C 10 Minuten

20

Das mittels PCR und den Primern SEQ ID No. 32 und SEQ ID No. 33 amplifizierte DNA-Fragment wurde mit an sich bekannten Methoden aus dem Agarosegel eluiert und mit den Restriktionsenzymen NcoI und HindIII geschnitten. Daraus resultiert ein 962 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (SEQ ID No. 34). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das NcoI/HindIII geschnittene Amplifikat in den Vektor pCB97-30 kloniert und der Klon pCB-gps erhalten.

25

- 30 Sequenzierung des Klons pCB-gps bestätigte eine Sequenz für die GGPP-Synthase aus *A. fulgidus*, die sich von der publizierten Sequenz AF120272 in einem Nukleotid unterscheidet. Durch das Einfügen einer NcoI-Schnittstelle im *gps*-Gen wurde das zweite Kodon der GGPP-Synthase verändert. In der publizierten Sequenz AF120272 kodiert CTG (Position 4-6) für Leucin. Durch die Amplifikation mit den beiden Primern SEQ ID No. 32 und SEQ ID No. 33 wurde dieses zweite Kodon in GTG verändert, welches für Valin kodiert.
- 35

Der Klon pCB-gps wurde daher für die Klonierung des *gps*-Gens in den Vektor pMCL-CrtYIBZ/idi verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des KpnI/XhoI-Fragmentes aus pCB-gps und Ligierung in den KpnI und XhoI geschnittenen Vektor pMCL-CrtYIBZ/idi. Das klonierte KpnI/XhoI-Fragment (SEQ ID No. 34) trägt den

5 Prrn16-Promotor zusammen mit einer minimalen 5'-UTR-Sequenz von *rbcL*, den ersten 6 Kodons von *rbcL*, die die GGPP-Synthase N-terminal verlängern, und 3' vom *gps*-Gen die *psbA*-Sequenz. Der N-Terminus der GGPP-Synthase hat somit anstelle der natürlichen Aminosäure-Abfolge mit Met-Leu-Lys-Glu (Aminosäure 1 bis 4 aus AF120272) die veränderte Aminosäure-Abfolge Met-Thr-Pro-Gln-Thr-Ala-Met-Val-Lys-

10 Glu. Daraus resultiert, dass die rekombinante GGPP-Synthase, beginnend mit Lys in Position 3 (in AF120272) identisch ist und keine weiteren Änderungen in der Aminosäuresequenz aufweist. Die *rbcL*- und *psbA*-Sequenzen wurden gemäß einer Referenz nach Eibl et al. (Plant J. 19. (1999), 1-13) verwendet. Der resultierende Klon heisst pMCL-CrtYIBZ/idi/gps.

#### Beispiel 3:

#### Biotransformation von Zeaxanthin in rekombinanten *E. coli*-Stämmen

Zur Zeaxanthin-Biotransformation wurden rekombinante *E. coli*-Stämme hergestellt,

20 welche durch heterologe Komplementation zur Zeaxanthin-Produktion befähigt sind. Stämme von *E. coli* TOP10 wurden als Wirtszellen für die Komplementations-Experimente mit den Plasmiden pNOSTF-G und pMCL-CrtYIBZ/idi/gps verwendet.

Um *E. coli*-Stämme herzustellen, die die Synthese von Zeaxanthin in hoher Konzentra-

25 tion ermöglichen, wurde das Plasmid pMCL-CrtYIBZ/idi/gps konstruiert. Das Plasmid trägt die Bioynthesegene *crtY*, *crtB*, *crtI* und *crtY* von *Erwinia uredovora*, das Gen *gps* (für Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase) aus *Archaeoglobus fulgidus* und das Gen *idi* (Isopentenylidiphosphat-Isomerase) aus *E. coli*. Mit diesem Konstrukt wurden limitierende Schritte für eine hohe Akkumulation von Carotinoiden und deren bio-

30 synthtischen Vorstufen beseitigt. Dies wurde zuvor von Wang et al. in ähnlicher Weise mit mehreren Plasmiden beschrieben (Wang, C.-W., Oh, M.-K. und Liao, J.C.; Engineered isoprenoid pathway enhances astaxanthin production in Escherichia coli, Biotechnology and Bioengineering 62 (1999), 235-241).

Kulturen von *E.coli* TOP10 wurden in an sich bekannter Weise mit den beiden Plasmiden pNOSTF-G und pMCL-CrtYIBZ/idi/gps transformiert und in LB-Medium bei 30°C bzw. 37°C über Nacht kultiviert. Ampicillin (50 µg/ml), Chloramphenicol (50 µg/ml) und Isopropyl-β-thiogalactosid (1 mmol) wurden in an sich üblicher Weise ebenfalls über Nacht zugegeben.

Zur Isolierung der Carotinoide aus den rekombinanten Stämmen wurden die Zellen mit Aceton extrahiert, das organische Lösungsmittel zur Trockne eingedampft und die Carotinoide mittels HPLC über eine C30-Säule aufgetrennt. Folgende Verfahrensbedingungen wurden eingestellt.

Trennsäule: ProntoSil C30-Säule, 250 x 4,6 mm, (Bischoff, Leonberg)

Flussrate: 1.0 ml/min

Eluenten: Laufmittel A - 100% Methanol

Laufmittel B - 80% Methanol, 0.2% Ammoniumacetat

Laufmittel C - 100% t-Butyl-methylether

Gradientprofil:

Zeit	Flussrate	% Laufmittel A	% Laufmittel B	% Laufmittel C
1.00	1.0	95.0	5.0	0
1.05	1.0	80.0	5.0	15.0
14.00	1.0	42.0	5.0	53.0
14.05	1.0	95.0	5.0	0
17.00	1.0	95.0	5.0	0
18.00	1.0	95.0	5.0	0

Detektion: 300 - 500 nm

Die Spektren wurden direkt aus den Elutionspeaks unter Verwendung eines Photodiodenarraydetektors bestimmt. Die isolierten Substanzen wurden über ihre Absorptionsspektren und ihre Retentionszeiten im Vergleich zu Standardproben identifiziert.

Abbildung 1 zeigt die chromatographische Analyse einer Probe erhalten aus einem mit pNOSTF-G und pMCL-CrtYIBZ/idi/gps transformierten *E. coli*-Stamm. Es zeigt sich,



daß dieser Stamm aufgrund der heterologen Komplementation verschiedene Ketocarotinoide synthetisieren kann. Mit zunehmender Retentionszeit werden Astaxanthin (Peak 1), Adonirubin (Peak 2) und Canthaxanthin (Peak 3) eluiert.

## 5 Beispiel 3.1

### Vergleichsbeispiel

Analog zu den vorhergehenden Beispielen wurde als Vergleichsbeispiel ein *E.coli*-Stamm hergestellt, der eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille exprimiert. Dazu wurde die cDNA die für die gesamte Primärsequenz der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille codiert amplifiziert und gemäß Beispiel 1 in den gleichen Expressionsvektor kloniert.

Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* codiert, wurde mittels PCR aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") Suspensionskultur amplifiziert. Für die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80), die 2 Wochen mit indirektem Tageslicht bei Raumtemperatur in *Haematococcus*-Medium (1.2 g/l Natriumacetat, 2 g/l Hefeextrakt, 0.2 g/l  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0.02  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; pH 6.8; nach Autoklavieren Zugabe von 400 mg/l L-Asparagin, 10 mg/l  $FeSO_4 \cdot xH_2O$ ) gewachsen war, wurden die Zellen geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert. Anschließend wurden 100 mg der gefrorenen, pulverisierten Algenzellen in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0.8 ml Trizol-Puffer (Life Technologies) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 0.2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12 000 g wurde der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

Für die cDNA-Synthese wurden 2.5 ug Gesamt-RNA für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers PR1 (gcaagctcga cagctacaaa cc) in cDNA umgeschrieben.

Die Nukleinsäure codierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers PR2 (gaagcatgca gctagcagcg acag) und eines antisense spezifischen Primers PR1 amplifiziert.

5

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz codiert, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem

10 enthalten war:

- 4 ml einer *Haematococcus pluvialis* cDNA (hergestellt wie oben beschrieben).
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR1
- 15 - 0.2 mM PR2
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 ml Aq. Dest.

20 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94\_C 2 Minuten

35X 94\_C 1 Minute

53\_C 2 Minuten

25 72\_C 3 Minuten

1X 72\_C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit PR1 und PR2 resultierte in einem 1155 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz codiert:

30

gaagcatgca	gctagcagcg	acagtaatgt	tggagcagct	taccggaagc	gctgaggcac	60
tcaaggagaa	ggagaaggag	gttgcaggca	gctctgacgt	gttgcgtaca	tgggcgaccc	120
agtactcgct	tccgtcagag	gagtcagacg	cggcccgcgc	gggactgaag	aatgcctaca	180
agccaccacc	ttccgacaca	aagggcatca	caatggcgct	agctgtcatc	ggctcctggg	240
ccgcagtggt	cctccacgcc	atTTTTTcaaa	tcaagcttcc	gacctccttg	gaccagctgc	300
actggctgcc	cgtgtcagat	gccacagctc	agctgggttag	cggcagcagc	agcctgctgc	360
acatcgctcg	agtattcttt	gtcctggagt	tcctgtacac	aggccttttt	atcaccacgc	420
atgatgctat	gcatggcacc	atcgccatga	gaaacaggca	gcttaatgac	ttcttgggca	480
gagtatgcat	ctccttgtag	gcctgggtttg	attacaacat	gctgcaccgc	aagcattggg	540
agcaccacaa	ccacactggc	gaggtgggca	aggaccctga	cttcacacag	ggaaaccctg	600
gcattgtgcc	ctggtttgcc	agcttcatgt	ccagctacat	gtcgatgtgg	cagtttgccg	660
gcctcgcata	gtggacgggtg	gtcatgcagc	tgctgggtgc	gccaatggcg	aacctgctgg	720

	tggttcattggc	ggccgcgccc	atcctgtccg	ccttccgctt	gttctacttt	ggcacgtaca	780
	tgccccacaa	gcctgagcct	ggcgccgcgt	caggctcttc	accagccgtc	atgaactggt	840
	ggaagtcgcg	cactagccag	gcgtccgacc	tggtcagctt	tctgacctgc	taccacttcg	900
	acctgcactg	ggagcaccac	cgctggccct	ttgccccctg	gtgggagctg	cccaactgcc	960
5	gccgcctgtc	tggccgaggt	ctggttcctg	cctagctgga	cacactgcag	tggggcctgc	1020
	tgccagctgg	gcatgcaggt	tgtggcagga	ctgggtgagg	tgaaaagctg	caggcgctgc	1080
	tgccggacac	gctgcatggg	ctaccctgtg	tagctgccgc	cactagggga	gggggtttgt	1140
	agctgtcgag	cttgc					

10

Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert und der Klon pGKETO2 erhalten.

15

Sequenzierung des Klons pGKETO2 mit dem T7- und dem SP6-Primer bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in den drei Codons 73, 114 und 119 in je einer Base von der publizierten Sequenz X86782 unterscheidet. Diese Nukleotidaustausche wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Haematococcus pluvialis* Stamm 192.80.

20

Dieser Klon wurde für die Klonierung in den unter Beispiel 1 beschriebenen Expressionsvektor verwendet. Die Klonierung erfolgte analog wie in Beispiel 1 beschrieben. Die Transformation der *E.coli* Stämme, deren Kultivierung und die Analyse des Carotinoidprofils erfolgte wie in Beispiel 3 beschrieben.

25

Abbildung 2 zeigt die chromatographische Analyse einer Probe erhalten aus einem mit diesem Expressionsvektor und pMCL-CrtYIBZ/idi/gps transformierten *E. coli*-Stamm. Unter Verwendung einer Ketolase aus *Haematococcus pluvialis*, wie beispielsweise in EP 725137 beschrieben, eluieren mit zunehmender Retentionszeit Astaxanthin (Peak 1), Adonixanthin (Peak 2) und nicht umgesetztes Zeaxanthin (Peak 3). Dieses Carotinoidprofil wurde bereits in EP 0725137 beschrieben.

30

Tabelle 1 zeigt einen Vergleich der bakteriell produzierten Carotinoidmengen:

35

Tabelle 1: Vergleich der bakteriellen Ketocarotinoid-Synthese bei Verwendung zweier verschiedener Ketolasen, der erfindungsgemäßen NOST-Ketolase aus *Nostoc* sp. PCC7120 (Beispiel 3) und der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* als Vergleichsbeispiel (Beispiel 3.1). Carotinoidmengen sind in ng/ ml Kulturflüssigkeit angegeben.

40

Ketolase aus	Astaxanthin	Adonirubin	Adonixanthin	Canthaxanthin	Zeaxanthin
<i>Haematococcus pluvialis</i> <i>Flotow em. Wille</i> (Vergleichsbeispiel)	13		102		738
<i>Nostoc sp. Strain</i> <i>PCC7120</i>	491	186		120	

Die erfindungsgemäße Expression der Ketolase aus *Nostoc sp. Strain PCC7120* führt zu einem Carotinoidmuster, welches sich von dem Carotinoidmuster nach Expression einer Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* deutlich unterscheidet. Während die Ketolase aus dem Stand der Technik nur sehr unvollständig das gewünschte Ketocarotinoid Astaxanthin liefert, ist Astaxanthin bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Ketolase das Hauptprodukt. Im erfindungsgemäßen Verfahren treten hydroxylierte Nebenprodukte in einer deutlich geringeren Menge auf.

#### 10 Beispiel 4:

Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der *Nostoc sp. PCC 7120* NOST-Ketolase in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

Die Expression der NOST-Ketolase aus *Nostoc sp. PCC7120* in *L. esculentum* und in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters FNR (Ferredoxin-NADPH- Oxidoreductase, Datenbankeintrag AB011474 Position 70127 bis 69493; WO03/006660), aus *Arabidopsis thaliana*. Das FNR-Gen beginnt bei Basenpaar 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP+ Reductase" annotiert. Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

20

Das DNA Fragment, das die FNR Promotorregion aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer FNR-A (SEQ ID No.38) und FNR-B (SEQ ID No. 39) hergestellt.

25

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das FNR-Promotorfragment FNR#1 ) beinhaltet, erfolgte in einem 50 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

30

- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM FNR-A (SEQ ID No. 38)
- 0.2 mM FNR-B (SEQ ID No. 39)
- 5 - 5 ul 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ul Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ul Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

10

1X 94°C 2 Minuten

35X 94°C 1 Minute

50°C 1 Minute

72°C 1 Minute

15 1X 72°C 10 Minuten

Das 647 bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pFNR#1 erhalten.

- 20 Sequenzierung des Klons pFNR#1 bestätigte eine Sequenz, die mit einem Sequenzabschnitt auf Chromosom 5 von *Arabidopsis thaliana* (Datenbankeintrag AB011474; WO03/006660) von Position 70127 bis 69493 übereinstimmt. Das FNR-Gen beginnt bei Basenpaar 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP+ Reductase" annotiert.

- 25 pFNR wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

- 30 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 637 bp SacI-HindIII Fragmentes aus pFNR#1 (partielle SacI Hydrolyse) und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter FNR#1 anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJITFNR.

Zur Herstellung einer Expressionskassette pJFNRNOST wurde das 799 bp SpHI-Fragment NOSTF-G (in Beispiel 1 beschrieben) in den SpHI geschnittenen Vektor

pJITFNR kloniert. Der Klon, der das Fragment NOSTF-G in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJFNRNOST.

Die Herstellung einer Expressionskassette für die *Agrobacterium* vermittelte Transformation der Ketolase aus *Nostoc* in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3FNR:NOST (MSP101) wurde das 2.425 bp SacI-XhoI Fragment (partielle SacI Hydrolyse) aus pJFNRNOST mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 3, Konstruktkarte). In der Abbildung 3 beinhaltet Fragment *FNR-Promotor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS TP Fragment* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *Nost Ketolase CDS* (777 bp) die gesamte Primärsequenz, kodierend für die *Nostoc* Ketolase, Fragment *35S Term* (746 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Die Herstellung einer Expressionskassette für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation des Expressionsvektor mit der Ketolase aus *Nostoc* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors pS5FNR:NOST (MSP102) wurde das 2.425 bp SacI-XhoI Fragment (partielle SacI Hydrolyse) aus pJFNRNOST mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 4, Konstruktkarte). In der Abbildung 4 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS Transit Peptide* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *Nost Ketolase* (777 bp) die gesamte Primärsequenz, kodierend für die *Nostoc* Ketolase, Fragment *35S Terminator* (746 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

#### Beispiel 5:

Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der *Nostoc sp. PCC 7120* NOST-Ketolase in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

Die Expression der Ketolase aus *Nostoc* in *L. esculentum* und *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298-10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711-1721).

Das DNA Fragment, das die AP3 Promoterregion -902 bis +15 aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer AP3-1 (SEQ ID No.41) und AP3-2 (SEQ ID No. 42) hergestellt.

5

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

10

- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM AP3-1 (SEQ ID No. 41)
- 0.2 mM AP3-2 (SEQ ID No. 42)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

15

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

20

- 1X 94°C 2 Minuten
- 35X 94°C 1 Minute
- 50°C 1 Minute
- 72°C 1 Minute

25

- 1X 72°C 10 Minuten

Das 929 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pAP3 erhalten.

30

Sequenzierung des Klons pAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298-10200) unterscheidet. Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert

und repräsentieren somit die tatsächliche Nukleotidsequenz in den verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen.

Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung  
 5 des Plasmids pAP3 hergestellt. Die Region 10200 - 9771 wurde mit den Primern AP3-1 (SEQ ID No. 41) und Primern AP3-4 (SEQ ID No. 44) amplifiziert (Amplifikat A1/4), die Region 9526-9285 wurde mit den AP3-3 (SEQ ID No. 43) und AP3-2 (SEQ ID No. 42) amplifiziert (Amplifikat A2/3).

10 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die die Regionen Region 10200 - 9771 und Region 9526-9285 des AP3 Promoters beinhalten, erfolgte in 50 µl Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

15

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM sense Primer (AP3-1 SEQ ID No. 41 bzw. AP3-3 SEQ ID No. 43)
- 0.2 mM antisense Primer (AP3-4 SEQ ID No. 44 bzw. AP3-2 SEQ ID No. 42)
- 20 - 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

25

1X 94°C 2 Minuten

35X 94°C 1 Minute

50°C 1 Minute

72°C 1 Minute

30 1X 72°C 10 Minuten

Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A1/4 und A2/3, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte  
 35 Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670 - 9526 deletiert sind.



Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) beider Amplifikate A1/4 und A2/3 erfolgte in einem 17.6 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 5     -     0.5 µg A1/4 Amplifikat
- 0.25 µg A2/3 Amplifikat

Das Auffüllen der 3'-Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 10     -     17.6 µl A1/4 und A2/3-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 µM dNTPs
- 2 µl 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

15

Die Nukleinsäure kodierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (AP3-1 SEQ ID No. 41) und eines antisense spezifischen Primers (AP3-2 SEQ ID No. 42) amplifiziert.

- 20     Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 25     -     1 µl Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM AP3-1 (SEQ ID No. 41)
- 0.2 mM AP3-2 (SEQ ID No. 42)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 30     -     0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 35     1X 94°C 2 Minuten
- 35X 94°C 1 Minute

50°C 1 Minute

72°C 1 Minute

1X 72°C 10 Minuten

- 5 Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 41 (AP3-1) und SEQ ID No. 42 (AP3-2) resultierte in einem 777 Bp Fragment, das für die modifizierte Promoterversion AP3P kodiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pAP3P erhalten. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200-9298 identische Sequenz, wobei die
- 10 interne Region 9285 - 9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

- Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 767 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus
- 15 pAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJITAP3P. Zur Herstellung einer Expressionskassette pJAP3NOST wurde das 799 Bp SpHI-Fragment NOSTF-G (in Beispiel 1 beschrieben) in den SpHI geschnittenen Vektor pJITAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment NOSTF-G in der korrekten Orientie-
- 20 rung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJAP3PNOST.

Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus Nostoc in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

- 25 Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3AP3:NOST (MSP103) wurde das 2.555 bp SacI-XhoI Fragment aus pJAP3NOST mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 5, Konstruktkarte). In der Abbildung 5 beinhaltet Fragment AP3P PROMOTER den modifizierten AP3P Promoter (765 bp), Fragment rbcS TP
- 30 FRAGMENT das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment NOST KETOLASE CDS (777bp) die gesamte Primärsequenz kodierend für die Nostoc Ketolase, Fragment 35S TERM (746 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus *Nostoc* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

- 5 Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AP3:NOST (MSP104) wurde das 2.555 bp SacI-XhoI Fragment aus pS5AP3PNOST mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 6, Konstruktkarte). In der Abbildung 6 beinhaltet Fragment AP3P PROMOTER den modifizierten AP3P Promoter (765 bp), Fragment rbcS TP FRAGMENT das rbcS Transitpeptid aus Erbse (207 bp), Fragment NOST KETOLASE CDS (777 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die *Nostoc* Ketolase, Fragment 35S TERM (746 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

#### Beispiel 6

- 15 Amplifikation einer DNA, die die gesamte Primärsequenz der NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 kodiert

Die DNA, die für die NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 kodiert, wurde mittels PCR aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 (Stamm der "American Type Culture Collection") amplifiziert.

20

Für die Präparation von genomischer DNA aus einer Suspensionskultur von *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, die 1 Woche mit Dauerlicht und konstantem Schütteln (150 rpm) at 25°C in BG 11-Medium (1.5 g/l NaNO<sub>3</sub>, 0.04 g/l K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 0.075 g/l MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.036 g/l CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.006 g/l citric acid, 0.006 g/l Ferric ammonium citrate, 0.001 g/l EDTA disodium magnesium, 0.04 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1ml Trace Metal Mix "A5+Co" (2.86 g/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.81 g/l MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.222 g/l ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.39 g/l Na-MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.079 g/l CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.0494 g/l Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) gewachsen war, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert.

30

Protokoll für die DNA-Isolation aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133:

- 35 Aus einer 10 ml Flüssigkultur wurden die Bakterienzellen durch 10 minütige Zentrifugation bei 8000 rpm pelletiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen in flüssigem Stickstoff mit einem Mörser zerstoßen und gemahlen. Das Zellmaterial wurde in 1 ml 10mM Tris\_HCl (pH 7.5) resuspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (2ml Vo-

lumen) überführt. Nach Zugabe von 100 µl Proteinase K (Konzentration: 20 mg/ml) wurde die Zellsuspension für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 500 µl Phenol extrahiert. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 13 000 upm wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion mit Phenol wurde 3mal wiederholt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 0.6 Volumen Isopropanol gefällt und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in 25 µl Wasser aufgenommen und unter Erhitzung auf 65°C gelöst.

Die Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (NP196-1, SEQ ID No. 54) und eines antisense-spezifischen Primers (NP196-2 SEQ ID No. 55) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war

- 1 µl einer *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM NP196-1 (SEQ ID No. 54)
- 0.2 mM NP196-2 (SEQ ID No. 55)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	55°C	1 Minuten

72°C      3 Minuten  
1X   72°C      10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 54 und SEQ ID No. 55 resultierte in einem 792 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (NP196, SEQ ID No. 56). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und der Klon pNP196 erhalten.

Sequenzierung des Klons pNP196 mit dem M13F- und dem M13R-Primer bestätigte eine Sequenz, welche mit der DNA-Sequenz von 140.571-139.810 des Datenbank-eintrages NZ\_AABC01000196 identisch ist (inverse orientiert zum veröffentlichten Datenbankeintrag) mit der Ausnahme, daß G in Position 140.571 durch A ersetzt wurde, um ein Standard-Startkodon ATG zu erzeugen. Diese Nukleotidsequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Nostoc punctiforme* ATCC 29133.

Dieser Klon pNP196 wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117(Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

pJIT117 wurde modifiziert, indem der 35S-Terminator durch den OCS-Terminator (Octopine Synthase) des Ti-Plasmides pTi15955 von *Agrobacterium tumefaciens* (Datenbankeintrag X00493 von Position 12,541-12,350, Gielen et al. (1984) EMBO J. 3 835-846) ersetzt wurde.

Das DNA-Fragment, das die OCS-Terminatorregion beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung des Plasmides pHELLSGATE (Datenbankeintrag AJ311874, Wesley et al. (2001) Plant J. 27 581-590, nach Standardmethoden aus *E.coli* isoliert) sowie der Primer OCS-1 (SEQ ID No. 58) und OCS-2 (SEQ ID No. 59) hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die die Octopin Synthase (OCS) Terminatorregion (SEQ ID No. 60) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten waren:

- 100 ng pHELLSGATE plasmid DNA
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM OCS-1 (SEQ ID No. 58)
- 0.2 mM OCS-2 (SEQ ID No. 59)
- 5 - 5 ul 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ul Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ul Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

10

1X 94°C 2 Minuten

35X 94°C 1 Minute

50°C 1 Minute

72°C 1 Minute

15 1X 72°C 10 Minuten

Das 210 bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pOCS erhalten.

- 20 Sequenzierung des Klons pOCS bestätigte eine Sequenz, die mit einem Sequenzabschnitt auf dem Ti-Plasmid pTi15955 von *Agrobacterium tumefaciens* (Datenbankeintrag X00493) von Position 12.541 bis 12.350 übereinstimmt.

- 25 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 210 bp Sall-XhoI Fragmentes aus pOCS und Ligierung in den Sall-XhoI geschnittenen Vektor pJIT117.

Dieser Klon heisst pJO und wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONP196 verwendet.

- 30 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 782 Bp SphI-Fragmentes aus pNP196 und Ligierung in den SphI geschnittenen Vektor pJO. Der Klon, der die NP196-Ketolase von *Nostoc punctiforme* in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJONP196.

Beispiel 7:

Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

- 5 Die Expression der NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *L. esculentum* und in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters FNR (Ferredoxin-NADPH- Oxidoreductase, Datenbankeintrag AB011474 Position 70127 bis 69493; WO03/006660), aus *Arabidopsis thaliana*. Das FNR-Gen beginnt bei Basenpaar 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP+ Reductase" annotiert. Die Expression erfolgte mit dem
- 10 Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).
- Das DNA Fragment, das die FNR Promotorregion aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer FNR-1 (SEQ ID No. 61) und FNR-2
- 15 (SEQ ID No. 62) hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

- Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das FNR-Promotorfragment FNR (SEQ ID No.
- 20 63) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM FNR-1 (SEQ ID No. 61)
- 5 - 0.2 mM FNR-2 (SEQ ID No. 62)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

- 30 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 1X 94°C 2 Minuten
- 35X 94°C 1 Minute
- 50°C 1 Minute
- 35 72°C 1 Minute

1X 72°C 10 Minuten

Das 652 bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pFNR erhalten.

5

Sequenzierung des Klon pFNR bestätigte eine Sequenz, die mit einem Sequenzabschnitt auf Chromosom 5 von *Arabidopsis thaliana* (Datenbankeintrag AB011474) von Position 70127 bis 69493 übereinstimmt.

10 Dieser Klon heisst pFNR und wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONP196 (in Beispiel 6 beschrieben) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 644 bp SmaI-HindIII Fragmentes aus pFNR und Ligierung in den Ecl136II-HindIII geschnittenen Vektor pJONP196. Der Klon, der den Promoter FNR anstelle des ursprünglichen Promoters d35S und das Fragment NP196 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJOFNR:NP196.

20 Die Herstellung einer Expressionskassette für die *Agrobacterium* vermittelte Transformation der NP196-Ketolase aus *Nostoc* in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

5 Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP105 wurde das 1.839 bp EcoRI-XhoI Fragment aus pJOFNR:NP196 mit dem EcoRI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 7, Konstruktkarte). In der Abbildung 7 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP196 KETO CDS* (761 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP196-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von der Octopin- Synthase.

30

Die Herstellung einer Expressionskassette für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation des Expressionsvektor mit der NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO 02/00900).

35



Zur Herstellung des Tagetes-Expressionsvektors MSP106 wurde das 1.839 bp EcoRI-XhoI Fragment aus pJOFNR:NP196 mit dem EcoRI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 8, Konstruktkarte). In der Abbildung 8 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP196 KETO CDS* (761 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP196-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

Beispiel 8:

- 10 Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*

15 Die Expression der NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *L. esculentum* und *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle des blütenspezifischen Promoters EPSPS aus *Petunia hybrida* (Datenbankeintrag M37029: Nukleotidregion 7-1787; Benfey et al. (1990) Plant Cell 2: 849-856).

- 20 Das DNA Fragment, das die EPSPS Promoterregion (SEQ ID No. 66) aus *Petunia hybrida* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Petunia hybrida* isoliert) sowie der Primer EPSPS-1 (SEQ ID No. 64) und EPSPS-2 (SEQ ID No. 65) hergestellt.

- 25 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das EPSPS-Promoterfragment (Datenbankeintrag M37029: Nukleotidregion 7-1787) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

30

- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM EPSPS-1 (SEQ ID No. 64)
- 0.2 mM EPSPS-2 (SEQ ID No. 65)
- 35 - 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)

- 28.8 ul Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 5 1X 94°C 2 Minuten
- 35X 94°C 1 Minute
- 50°C 1 Minute
- 72°C 2 Minute
- 1X 72°C 10 Minuten

10

Das 1773 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pEPSPS erhalten.

15

Sequenzierung des Klons pEPSPS bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich durch zwei Deletion (Basen ctaagttcagga in Position 46-58 der Sequenz M37029; Basen aaaaaatat in Position 1422-1429 der Sequenz M37029) und die Basenaustausche (T statt G in Position 1447 der Sequenz M37029; A statt C in Position 1525 der Sequenz M37029; A statt G in Position 1627 der Sequenz M37029) von der publizierten EPSPS-Sequenz (Datenbankeintrag M37029: Nukleotidregion 7-1787) unterscheidet. Die zwei

20

Deletionen und die zwei Basenaustausche an den Positionen 1447 und 1627 der Sequenz M37029 wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die tatsächliche Nukleotidsequenz in den verwendeten *Petunia hybrida* Pflanzen.

25

Der Klon pEPSPS wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONP196 (in Beispiel 6 beschrieben) verwendet.

30

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1763 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pEPSPS und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJONP196. Der Klon, der den Promoter EPSPS anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJOESP:NP196. Diese Expressionskassette enthält das Fragment NP196 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS-Transitpeptid.

35

Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der EPSPS-kontrollierten NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC

29133 in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP107 wurde das 2.961 KB bp SacI-XhoI Fragment aus pJOESP:NP196 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 9, Konstruktkarte). In der Abbildung 9 beinhaltet Fragment EPSPS den EPSPS Promoter (1761 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP196 KETO CDS* (761 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP196-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der EPSPS-kontrollierten NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP108 wurde das 2.961 KB bp SacI-XhoI Fragment aus pJOESP:NP196 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 10, Konstruktkarte). In der Abbildung 10 beinhaltet Fragment EPSPS den EPSPS Promoter (1761 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP196 KETO CDS* (761 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP196-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

#### Beispiel 9:

Amplifikation einer DNA, die die gesamte Primärsequenz der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 kodiert

Die DNA, die für die NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 kodiert, wurde mittels PCR aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 (Stamm der "American Type Culture Collection") amplifiziert. Die Präparation von genomischer DNA aus einer Suspensionskultur von *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 wurde in Beispiel 19 beschrieben.

Die Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (NP195-1, SEQ ID No. 67) und eines antisense-spezifischen Primers (NP195-2 SEQ ID No. 68) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl einer *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM NP195-1 (SEQ ID No. 67)
- 0.2 mM NP195-2 (SEQ ID No. 68)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94°C 2 Minuten

35X 94°C 1 Minute

55°C 1 Minuten

72°C 3 Minuten

1X 72°C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 67 und SEQ ID No. 68 resultierte in einem 819 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (NP195, SEQ ID No. 69). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und der Klon pNP195 erhalten.

Sequenzierung des Klons pNP195 mit dem M13F- und dem M13R-Primer bestätigte eine Sequenz, welche mit der DNA-Sequenz von 55,604-56,392 des Datenbank-eintrages NZ\_AABC010001965 identisch ist, mit der Ausnahme, daß T in Position 55.604 durch A ersetzt wurde, um ein Standard-Startkodon ATG zu erzeugen. Diese Nukleotidsequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reprodu-

ziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Nostoc punctiforme* ATCC 29133.

Dieser Klon pNP195 wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJO (in Beispiel 6 beschrieben) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 809 Bp SphI-Fragmentes aus pNP195 und Ligierung in den SphI geschnittenen Vektor pJO. Der Klon, der die NP195-Ketolase von *Nostoc punctiforme* in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJONP195.

Beispiel 10:

Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

Die Expression der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *L. esculentum* und in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters FNR (Ferredoxin-NADPH-Oxidoreductase, Datenbankeintrag AB011474 Position 70127 bis 69493; WO03/006660), aus *Arabidopsis thaliana*. Das FNR-Gen beginnt bei Basenpaar 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP+ Reductase" annotiert. Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

Der Klon pFNR (in Beispiel 7 beschrieben) wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONP195 (in Beispiel 10 beschrieben) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 644 bp Sma-HindIII Fragmentes aus pFNR und Ligierung in den Ecl136II-HindIII geschnittenen Vektor pJONP195. Der Klon, der den Promoter FNR anstelle des ursprünglichen Promoters d35S und das Fragment NP195 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJOFNR:NP195.

Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium vermittelte Transformation der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP109 wurde das 1.866 bp EcoRI-XhoI Fragment aus pJOFNR:NP195 mit dem EcoRI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 li-

giert (Abbildung 11, Konstruktkarte). In der Abbildung 11 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP195 KETO CDS* (789 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP195-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von der Octopin- Synthase.

Die Herstellung einer Expressionskassette für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation des Expressionsvektor mit der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* *punctiforme* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO 02/00900).

Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors MSP110 wurde das 1.866 bp EcoRI-XhoI Fragment aus pJOFNR:NP195 mit dem EcoRI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 12, Konstruktkarte). In der Abbildung 12 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP195 KETO CDS* (789 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP195-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

#### Beispiel 11:

Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

Die Expression der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *L. esculentum* und *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle des blütenspezifischen Promoters EPSPS aus *Petunia hybrida* (Datenbankeintrag M37029: Nukleotidregion 7-1787; Benfey et al. (1990) Plant Cell 2: 849-856).

Der Klon pEPSPS (in Beispiel 8 beschrieben) wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONP195 (in Beispiel 10 beschrieben) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1763 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pEPSPS und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJONP195. Der Klon, der den Promoter EPSPS anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst

pJOESP:NP195. Diese Expressionskassette enthält das Fragment NP195 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem *rbcS*-Transitpeptid.

Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der EPSPS-kontrollierten NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO 02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP111 wurde das 2.988 KB bp *SacI*-*XhoI* Fragment aus pJOESP:NP195 mit dem *SacI*-*XhoI* geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 13, Konstruktkarte). In der Abbildung 13 beinhaltet Fragment EPSPS den EPSPS Promoter (1761 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP195 KETO CDS* (789 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP195-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der EPSPS-kontrollierten NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP112 wurde das 2.988 KB bp *SacI*-*XhoI* Fragment aus pJOESP:NP195 mit dem *SacI*-*XhoI* geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 14, Konstruktkarte). In der Abbildung 14 beinhaltet Fragment EPSPS den EPSPS Promoter (1761 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP195 KETO CDS* (789 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP195-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

Beispiel 12:

Amplifikation einer DNA, die die gesamte Primärsequenz der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea* NSOR10 codiert.

Die DNA, die für die Ketolase aus *Nodularia spumignea* NSOR10 kodiert, wurde mittels PCR aus *Nodularia spumignea* NSOR10 amplifiziert.

Für die Präparation von genomischer DNA aus einer Suspensionskultur von *Nodularia spumigena* NSOR10, die 1 Woche mit Dauerlicht und konstantem Schütteln (150 rpm) at 25°C in BG 11-Medium (1.5 g/l NaNO<sub>3</sub>, 0.04 g/l K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 0.075 g/l MgSO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O, 0.036 g/l CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.006 g/l citric acid, 0.006 g/l Ferric ammonium citrate, 0.001 g/l EDTA disodium magnesium, 0.04 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1ml Trace Metal Mix "A5+Co" (2.86 g/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.81 g/l MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.222 g/l ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.39 g/l NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.079 g/l CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.0494 g/l Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) gewachsen war, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert.

#### 10 Protokoll für die DNA-Isolation aus *Nodularia spumigena* NSOR10:

Aus einer 10 ml Flüssigkultur wurden die Bakterienzellen durch 10 minütige Zentrifugation bei 8000 rpm pelletiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen in flüssigem Stickstoff mit einem Mörser zerstoßen und gemahlen. Das Zellmaterial wurde in 1 ml 10mM Tris\_HCl (pH 7.5) resuspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (2ml Volumen) überführt. Nach Zugabe von 100 µl Proteinase K (Konzentration: 20 mg/ml) wurde die Zellsuspension für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 500 µl Phenol extrahiert. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 13 000 upm wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion mit Phenol wurde 3mal wiederholt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 0.6 Volumen Isopropanol gefällt und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in 25 µl Wasser aufgenommen und unter Erhitzung auf 65°C gelöst.

Die Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase aus *Nodularia spumigena* NSOR10, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) aus *Nodularia spumigena* NSOR10 unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (NODK-1, SEQ ID No. 71) und eines antisense-spezifischen Primers (NODK-2 SEQ ID No. 72) amplifiziert.

30

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem ent-

35 halten war:



- 1 ul einer *Nodularia spumignea* NSOR10 DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM NODK-1 (SEQ ID No. 71)
- 5 - 0.2 mM NODK-2 (SEQ ID No. 72)
- 5 ul 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ul R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 ul Aq. Dest.

10 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 1X 94°C 2 Minuten
- 35X 94°C 1 Minute
- 55°C 1 Minuten
- 15 72°C 3 Minuten
- 1X 72°C 10 Minuten

20 Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 71 und SEQ ID No. 72 resultierte in einem 720 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (NODK, SEQ ID No. 73). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und der Klon pNODK erhalten.

5 Sequenzierung des Klons pNODK mit dem M13F- und dem M13R-Primer bestätigte eine Sequenz, welche mit der DNA-Sequenz von 2130-2819 des Datenbank-eintrages AY210783 identisch ist (inverse orientiert zum veröffentlichten Datenbankeintrag). Diese Nukleotidsequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Nodularia spumignea* NSOR10.

30 Dieser Klon pNODK wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJ0 (in Beispiel 6 beschrieben) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 710 Bp SphI-Fragmentes aus pNODK und Ligierung in den SphI geschnittenen Vektor pJ0. Der Klon, der die NODK-Ketolase von *Nodularia spumignea* in der korrekten Orientie-

ung als N-terminale translationale Fusion mit dem *rbcS* Transitpeptid enthält, heisst pJONODK.

Beispiel 13:

- 5 Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea* NSOR10 in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

Die Expression der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea* NSOR10 in *L. esculentum* und in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters FNR (Ferrodoxin-NADPH- Oxidoreductase, Datenbankeintrag AB011474 Position 70127 bis 69493; WO03/006660), aus *Arabidopsis thaliana*. Das FNR-Gen beginnt bei Basen-

10 paar 69492 und ist mit "Ferrodoxin-NADP+ Reductase" annotiert. Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid *rbcS* aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

15 Der Klon pFNR (in Beispiel 7 beschrieben) wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONODK (in Beispiel 12 beschrieben) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 644 bp Sma-HindIII Fragmentes aus pFNR und Ligierung in den Ecl136II-HindIII geschnittenen Vektor pJONODK. Der Klon, der den Promoter FNR anstelle des ursprünglichen Promoters d35S und das Fragment NODK in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem *rbcS* Transitpeptid enthält, heisst pJOFNR:NODK.

20

- 25 Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium vermittelte Transformation der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea* NSOR10 in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP113 wurde das 1.767 bp EcoRI-XhoI Fragment aus pJOFNR:NODK mit dem EcoRI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 15, Konstruktkarte). In der Abbildung 15 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NODK KETO CDS* (690 bp), kodierend für die *Nodularia spumignea* NSOR10 NODK-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von der Octopin- Synthase.

30

35

Die Herstellung einer Expressionskassette für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation des Expressionsvektor mit der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea NSOR10* punctiforme in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

5

Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors MSP114 wurde das 1.767 bp EcoRI-XhoI Fragment aus pJOFNR:NODK mit dem EcoRI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 16, Konstruktkarte). In der Abbildung 16 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment NODK KETO CDS (690 bp), kodierend für die *Nodularia spumignea NSOR10* NODK-Ketolase, Fragment OCS Terminator (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

10

Beispiel 14:

15

Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea NSOR10* in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

Die Expression der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea NSOR10* in *L. esculentum* und *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle des blütenspezifischen Promoters EPSPS aus *Petunia hybrida* (Datenbankeintrag M37029: Nukleotidregion 7-1787; Benfey et al. (1990) Plant Cell 2: 849-856).

20

25

Der Klon pEPSPS (in Beispiel 8 beschrieben) wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONODK (in Beispiel 12 beschrieben) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1763 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pEPSPS und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJONODK. Der Klon, der den Promoter EPSPS anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJOESP:NODK. Diese Expressionskassette enthält das Fragment NODK in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS-Transitpeptid.

30

35

Die Herstellung eines Expressionsvektors für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation der EPSPS-kontrollierten NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea NSOR10*

in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO 02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP115 wurde das 2.889 KB bp SacI-XhoI Fragment aus pJOESP:NODK mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 17, Konstruktkarte). In der Abbildung 17 beinhaltet Fragment EPSPS den EPSPS Promoter (1761 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NODK KETO CDS* (690 bp), kodierend für die *Nodularia spumignea NSOR10* NODK-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der EPSPS-kontrollierten NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea NSOR10* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP116 wurde das 2.889 KB bp SacI-XhoI Fragment aus pJOESP:NODK mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 18, Konstruktkarte). In der Abbildung 18 beinhaltet Fragment EPSPS den EPSPS Promoter (1761 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NODK KETO CDS* (690 bp), kodierend für die *Nodularia spumignea NSOR10* NODK-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

#### Beispiel 15:

Herstellung transgener *Lycopersicon esculentum* Pflanzen

Transformation und Regeneration von Tomatenpflanzen erfolgte nach der publizierten Methode von Ling und Mitarbeitern (Plant Cell Reports (1998), 17:843-847). Für die Varietät Microtom wurde mit höherer Kanamycin-Konzentration (100mg/L) selektioniert.

Als Ausgangsexplantat für die Transformation dienten Kotyledonen und Hypokotyle sieben bis zehn Tage alter Keimlinge der Linie Microtom. Für die Keimung wurde das Kulturmedium nach Murashige und Skoog (1962: Murashige and Skoog, 1962, Physiol. Plant 15, 473-) mit 2% Saccharose, pH 6,1 verwendet. Die Keimung fand bei 21°C bei wenig Licht (20 - 100 µE) statt. Nach sieben bis zehn Tagen wurden die Kotyledonen

quer geteilt und die Hypokotyle in ca. 5 - 10 mm lange Abschnitte geschnitten und auf das Medium MSBN (MS, pH 6,1, 3% Saccharose + 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l NAA) gelegt, das am Vortag mit suspensionskultivierten Tomatenzellen beschickt wurde. Die Tomatenzellen wurden luftblasenfrei mit sterilem Filterpapier abgedeckt. Die Vorkultur der

5 Explantate auf dem beschriebenen Medium erfolgte für drei bis fünf Tage. Zellen des Stammes *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 wurden einzeln mit den Plasmiden pS3FNR:NOST, pS3AP3:NOST, pS3FNR:NP196, pS3EPS:NP196, pS3FNR:NP195, pS3EPS:NP195, pS3FNR:NODK und pS3EPS:NODK transformiert. Von den einzelnen mit den Binärvektoren pS3FNRNOST, pS3AP3NOST, pS3FNR:NP196,

10 pS3EPS:NP196, pS3FNR:NP195, pS3EPS:NP195, pS3FNR:NODK und pS3EPS:NODK transformierten *Agrobacterium*-Stämmen wurde jeweils eine Übernachtkultur in YEB Medium mit Kanamycin (20 mg/l) bei 28 °C kultiviert und die Zellen zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde mit flüssigem MS Medium (3% Saccharose, pH 6,1) resuspendiert und auf eine optische Dichte von 0,3 (bei 600 nm) eingestellt.

15 Die vorkultivierten Explantate wurden in die Suspension überführt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Explantate mit sterilem Filterpapier getrocknet und für die dreitägige Co-Kultur (21°C) auf ihr Vorkulturmedium zurück gelegt.

20 Nach der Co-kultur wurden die Explantate auf MSZ2 Medium (MS pH 6,1 + 3% Saccharose, 2 mg/l Zeatin, 100 mg/l Kanamycin, 160 mg/l Timentin) transferiert und für die selektive Regeneration bei 21°C unter Schwachlicht Bedingungen (20 - 100 µE, Licht-rhythmus 16h/8h) aufbewahrt. Alle zwei bis drei Wochen erfolgte der Transfer der Explantate bis sich Sprosse bilden. Kleine Sprosse konnten vom Explantat abgetrennt

25 werden und auf MS (pH 6,1 + 3% Saccharose) 160 mg/l Timentin, 30 mg/l Kanamycin, 0,1 mg/l IAA bewurzelt werden. Bewurzelte Pflanzen wurden ins Gewächshaus überführt.

30 Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien erhalten:

Mit pS3FNR:NOST wurde erhalten: MSP101-1, MSP101-2, MSP101-3

Mit pS3AP3:NOST wurde erhalten: MSP103-1, MSP103-2, MSP103-3

Mit pS3FNR:NP196 wurde erhalten: MSP105-1, MSP105-2, MSP105-3

Mit pS3EPS:NP196 wurde erhalten: MSP107-1, MSP107-2, MSP107-3

5 Mit pS3FNR:NP195 wurde erhalten: MSP109-1, MSP109-2, MSP109-3

Mit pS3EPS:NP195 wurde erhalten: MSP111-1, MSP111-2, MSP111-3

Mit pS3FNR:NODK wurde erhalten: MSP113-1, MSP113-2, MSP113-3

10 Mit pS3EPS:NODK wurde erhalten: MSP115-1, MSP115-2, MSP115-3

● Beispiel 16:

Herstellung transgener Tagetes Pflanzen

15

Tagetessamen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, *Physiol. Plant.* 15(1962), 473-497) pH 5,8, 2% Saccharose) aufgelegt. Die Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18-28°C/20-200  $\mu$ E/3 - 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21°C, 20-70  $\mu$ E, für 4-8 Wochen.

20

Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten in vitro Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 - 60 mm<sup>2</sup> werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS - Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

25

● Ein beliebiger Agrobakterium tumefaciens Stamm, bevorzugt aber ein supervirulenter Stamm, wie z.B. EHA105 mit einem entsprechenden Binärplasmid, das ein Selektionsmarkergen (bevorzugt *bar* oder *pat*) sowie ein oder mehrere Trait- oder Reporter-gene tragen kann wird (pS5FNR:NOST, pS5AP3:NOST pS5FNR:NP196,

30

pS5EPS:NP196, pS5FNR:NP195, pS5EPS:NP195, pS5FNR:NODK und pS5EPS:NODK), über Nacht angezogen und für die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet. Die Anzucht des Bakterienstammes kann wie folgt erfolgen: Eine Einzelkolonie des entsprechenden Stammes wird in YEB (0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat x 7 H<sub>2</sub>O) mit

35

25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28°C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wird die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min geerntet und

derart in flüssigem MS Medium resuspendiert, daß eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension wird fuer die C-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.

- Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakteriensuspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolylessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 – 80  $\mu\text{Mol/m}^2 \times \text{sec}$ , Temperatur: 22 – 24°C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzentration von 200 bis 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.

- Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sproßknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l Gibberillinsäure GA<sub>3</sub>, zur Bewurzelung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.

- Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:

Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 - 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert

werden. Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.

5 Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.

Die Zugabe von  $\text{AgNO}_3$  (3 - 10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.

10 Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.

15 Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.

Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien erhalten:

20 Mit pS5FNR:NOST wurde beispielsweise erhalten: MSP102-1, MSP102-2, MSP102-3,

Mit pS5AP3:NOST wurde beispielsweise erhalten: MSP104-1, MSP104-2, MSP104-3

Mit pS5FNR:NP196 wurde erhalten: MSP106-1, MSP106-2, MSP106-3

25

Mit pS5EPS:NP196 wurde erhalten: MSP108-1, MSP108-2, MSP108-3

Mit pS5FNR:NP195 wurde erhalten: MSP110-1, MSP110-2, MSP110-3

30 Mit pS5EPS:NP195 wurde erhalten: MSP112-1, MSP112-2, MSP112-3

Mit pS5FNR:NODK wurde erhalten: MSP114-1, MSP114-2, MSP114-3

Mit pS5EPS:NODK wurde erhalten: MSP116-1, MSP116-2, MSP116-3

35



## Beispiel 17

## Charakterisierung der transgenen Pflanzenblüten

## Beispiel 9.1

## 5 Trennung von Carotinoidestern in Blütenblättern transgener Pflanzen

## Allgemeine Arbeitsvorschrift:

10 Die Blütenblätter der transgenen Pflanzen werden in flüssigem Stickstoff gemörsert und das Petalpulver (etwa 40 mg) mit 100% Aceton extrahiert (dreimal je 500 µl). Das Lösungsmittel wird evaporiert und die Carotinoide in 100-200 µl Petrolether/Aceton (5:1, v/v) resuspendiert.

15 Die Carotinoide werden in konzentrierter Form mittels Dünnschicht-Chromatographie (TLC) auf Silica60 F254- Platten (Merck) in einem organischen Laufmittel (Petrolether/Aceton; 5:1) entsprechend ihrer Phobizität aufgetrennt. Gelbe (Xanthophyllester), rote (Ketocarotinoidester) und orange Banden (Mischung aus Xanthophyll- und Ketocarotinoidestern) auf der TLC werden ausgekratzt.

20 Die an Silica gebundenen Carotinoide werden dreimal mit 500 µl Aceton eluiert, das Lösungsmittel evaporiert und die Carotinoide mittels HPLC aufgetrennt und identifiziert.

25 Mittels einer C30-reverse phase-Säule kann zwischen Mono- und Diestern der Carotinoide unterschieden werden. HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al.(2000), Plant Journal 24(4): 551-558). Folgende Verfahrensbedingungen wurden eingestellt.

Trennsäule: ProntoSil C30-Säule, 250 x 4,6 mm, (Bischoff, Leonberg)

Flussrate: 1.0 ml/min

30 Eluenten: Laufmittel A - 100% Methanol

Laufmittel B - 80% Methanol, 0.2% Ammoniumacetat

Laufmittel C - 100% t-Butyl-methylether

Gradientprofil:

Zeit	Flussrate	% Laufmittel A	% Laufmittel B	% Laufmittel C
12.0	1.0	95.0	5.0	0
12.1	1.0	80.0	5.0	15.0
22.0	1.0	76.0	5.0	19.0
22.0	1.0	66.5	5.0	28.5
38.0	1.0	15.0	5.0	80.0
45.0	1.0	95.0	5.0	0
46.0	1.0	95.0	5.0	0
46.1	1.0	95.0	5.0	0

Detektion: 300 - 500 nm

- 5 Eine Identifizierung der Carotinoide ist aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich.

Petalenmaterial der transgenen Tomatenpflanzen wird gemörsert und mit Aceton extrahiert. Extrahierte Carotinoide werden mittels TLC aufgetrennt. In den Linien können Mono- und Diester von Ketocarotinoiden detektiert werden; die Monoester sind in deutlich geringerer Konzentration als die Diester vorhanden.

10

## Beispiel 18

Enzymatische Hydrolyse von Carotinoidestern und Identifizierung der Carotinoide

- 15 Allgemeine Arbeitsvorschrift

Gemörsertes Petalenmaterial (30-100 mg Frischgewicht) wird mit 100% Aceton (dreimal 500ul; jeweils etwa 15 Minuten schütteln) extrahiert. Das Lösungsmittel wird evaporiert. Carotinoide werden anschließend in 495 ul Aceton aufgenommen, 4,95 ml Kalium-phosphatpuffer (100 mM, pH7.4) zugegeben und gut gemischt. Danach erfolgt die Zugabe von ca. 17 mg Bile-Salze (Sigma) und 149 µl einer NaCl/CaCl<sub>2</sub>-Lösung (3M NaCl und 75 mM CaCl<sub>2</sub>). Die Suspension wird für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Für die enzymatische Hydrolyse der Carotinoidester wird 595 µl einer Lipaselösung (50 mg/ml Lipase Typ7 von *Candida rugosa*(Sigma)) zugegeben und unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach etwa 21 Stunden erfolgte nochmals eine Zugabe von 595 µl Lipase mit erneuter Inkubation von mindestens 5 Stunden bei 37°C. Anschließend werden

25

etwa ca. 700 mg  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  in der Lösung gelöst. Nach Zugabe von 1800  $\mu\text{l}$  Petrolether werden die Carotinoide durch kräftig Mischen in die organische Phase extrahiert. Dieses Ausschütteln wird solange wiederholt, bis die organische Phase farblos bleibt. Die Petroletherfraktionen werden vereinigt und der Petrolether evaporiert. Freie

- 5 Carotinoide werden in 100-120  $\mu\text{l}$  Aceton aufgenommen. Mittels HPLC und C30-reverse phase-Säule können freie Carotinoide aufgrund von Retentionszeit und UV-VIS-Spektren identifiziert werden.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität aufweisen, und die veränderte Ketolase-Aktivität durch eine Ketolase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Organismen verwendet, die als Wildtyp bereits eine Ketolase-Aktivität aufweisen, und die genetische Veränderung eine Erhöhung der Ketolase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp bewirkt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Ketolase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, gegenüber dem Wildtyp erhöht.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression Nukleinsäuren in den Organismus einbringt, die Ketolasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Organismen verwendet, die als Wildtyp keine Ketolase-Aktivität aufweisen und die genetische Veränderung eine Ketolase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp verursacht.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Organismen verwendet, die transgen eine Ketolase, enthaltend die Ami-

nosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, exprimieren.

5

7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Verursachung der Genexpression Nukleinsäuren in die Organismen einbringt, die Ketolasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

10

8. Verfahren nach Anspruch 5 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 1 einbringt.

15

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Organismen zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Hydroxylase-Aktivität und  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, aufweisen.

20

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass man zur zusätzlichen Erhöhung mindestens einer der Aktivitäten, die Genexpression mindestens einer Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase, und Nukleinsäuren, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, gegenüber dem Wildtyp erhöht.

25

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression mindestens eine Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und Nukleinsäuren kodierend eine  $\beta$ -Cyclase in den Organismus einbringt.

30

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, Nukleinsäuren einbringt, die eine Hydroxylase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 16 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren

35

abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 16 aufweist.

- 5 13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 15 einbringt.
- 10 14. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, Nukleinsäuren einbringt, die eine  $\beta$ -Cyclase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 18 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 18 aufweist.
- 15 15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 17 einbringt.
- 20 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass man nach dem Kultivieren die genetisch veränderten Organismen erntet und anschließend die Ketocarotinoide aus den Organismen isoliert.
- 25 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet daß man als Organismus einen Organismus verwendet, der als Ausgangsorganismus natürlicherweise oder durch genetische Komplementierung oder Umregulierung von Stoffwechselwegen in der Lage ist, Carotinoide herzustellen.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß man als Organismen Mikroorganismen oder Pflanzen verwendet.
- 30 19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß man als Mikroorganismen Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze verwendet.
- 35 20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen ausgewählt sind aus der Gruppe *Escherichia*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Nostoc*, Cyanobakterien der Gattung *Synechocystis*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Phaffia*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Tri-*

*choderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Blakeslea*, *Phycomyces*, *Fusarium*, *Haemato-*  
*coccus*, *Phaedactylum tricornatum*, *Volvox* oder *Dunaliella*.

21. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß man als Organis-  
mus Pflanzen verwendet.
22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze  
eine Pflanze, ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Pa-  
paveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassi-  
ceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentia-  
naceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae,  
Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchida-  
ceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae verwendet.
23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze  
eine Pflanze, ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, *Tagetes erecta*,  
*Tagetes patula*, *Acacia*, *Aconitum*, *Adonis*, *Arnica*, *Aquilegia*, *Aster*, *Astragalus*,  
*Bignonia*, *Calendula*, *Caltha*, *Campanula*, *Canna*, *Centaura*, *Cheiranthus*,  
*Chrysanthemum*, *Citrus*, *Crepis*, *Crocus*, *Curcubita*, *Cytisus*, *Delonia*, *Delphini-*  
*um*, *Dianthus*, *Dimorphotheca*, *Doronicum*, *Eschscholtzia*, *Forsythia*, *Fremontia*,  
*Gazania*, *Gelsemium*, *Genista*, *Gentiana*, *Geranium*, *Gerbera*, *Geum*, *Grevillea*,  
*Helenium*, *Helianthus*, *Hepatica*, *Heracleum*, *Hisbiscus*, *Heliopsis*, *Hypericum*,  
*Hypochoeris*, *Impatiens*, *Iris*, *Jacaranda*, *Kerria*, *Laburnum*, *Lathyrus*, *Leonto-*  
*don*, *Lilium*, *Linum*, *Lotus*, *Lycopersicon*, *Lysimachia*, *Maratia*, *Medicago*, *Mimu-*  
*lus*, *Narcissus*, *Oenothera*, *Osmanthus*, *Petunia*, *Photinia*, *Physalis*, *Phyteuma*,  
*Potentilla*, *Pyracantha*, *Ranunculus*, *Rhododendron*, *Rosa*, *Rudbeckia*, *Senecio*,  
*Silene*, *Silphium*, *Sinapsis*, *Sorbus*, *Spartium*, *Tecoma*, *Torenia*, *Tragopogon*,  
*Trollius*, *Tropaeolum*, *Tulipa*, *Tussilago*, *Ulex*, *Viola* oder *Zinnia* verwendet.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass  
die Ketocarotinoide ausgewählt sind aus der Gruppe Astaxanthin, Cantha-  
xanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und  
Adonixanthin.

25. Genetisch veränderter Organismus, wobei die genetische Veränderung die Aktivität einer Ketolase

A für den Fall, dass der Wildtyporganismus bereits eine Ketolase-Aktivität aufweist, gegenüber dem Wildtyp erhöht und

B für den Fall, dass der Wildtyporganismus keine Ketolase-Aktivität aufweist, gegenüber dem Wildtyp verursacht

und die nach A erhöhte oder nach B verursachte Ketolase-Aktivität durch eine Ketolase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

26. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Erhöhung oder Verursachung der Ketolase-Aktivität durch eine Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, gegenüber dem Wildtyp bewirkt wird.

27. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung oder Verursachung der Genexpression Nukleinsäuren in den Organismus einbringt, die Ketolasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

28. Genetisch veränderter Organismus, enthaltend mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion



von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

- 5 29. Genetisch veränderter Organismus, enthaltend mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
- 10 30. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass die genetische Veränderung zusätzlich mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Hydroxylase-Aktivität und  $\beta$ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp erhöht.
- 15 31. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 30, dadurch gekennzeichnet daß er als Ausgangsorganismus natürlicherweise oder durch genetische Komplementierung in der Lage ist, Carotinoide herzustellen.
- 20 32. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 31, ausgewählt aus der Gruppe Mikroorganismen oder Pflanzen.
- 25 33. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen ausgewählt sind aus der Gruppe Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.
- 30 34. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen ausgewählt sind aus der Gruppe *Escherichia*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Nostoc*, Cyanobakterien der Gattung *Synechocystis*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Blakeslea*, *Phycomyces*, *Fusarium*, *Haematococcus*, *Phaedactylum tricornatum*, *Volvox* oder *Dunaliella*.
- 35 35. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanzen ausgewählt sind aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Bras-

siceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae verwendet.

5

36. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, dass Pflanzen ausgewählt sind aus den Pflanzengattungen Marigold, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Acacia*, *Aconitum*, *Adonis*, *Arnica*, *Aquilegia*, *Aster*, *Astragalus*, *Bignonia*, *Calendula*, *Caltha*, *Campanula*, *Canna*, *Centaurea*, *Cheiranthus*, *Chrysanthemum*, *Citrus*, *Crepis*, *Crocus*, *Curcubita*, *Cytisus*, *Delonia*, *Delphinium*, *Dianthus*, *Dimorphotheca*, *Doronicum*, *Eschscholtzia*, *Forsythia*, *Fremontia*, *Gazania*, *Gelsemium*, *Genista*, *Gentiana*, *Geranium*, *Gerbera*, *Geum*, *Grevillea*, *Helenium*, *Helianthus*, *Hepatica*, *Heracleum*, *Hisbiscus*, *Heliopsis*, *Hypericum*, *Hypochoeris*, *Impatiens*, *Iris*, *Jacaranda*, *Kerria*, *Laburnum*, *Lathyrus*, *Leontodon*, *Lilium*, *Linum*, *Lotus*, *Lycopersicon*, *Lysimachia*, *Maratia*, *Medicago*, *Mimulus*, *Narcissus*, *Oenothera*, *Osmanthus*, *Petunia*, *Photinia*, *Physalis*, *Phyteuma*, *Potentilla*, *Pyracantha*, *Ranunculus*, *Rhododendron*, *Rosa*, *Rudbeckia*, *Senecio*, *Silene*, *Silphium*, *Sinapsis*, *Sorbus*, *Spartium*, *Tecoma*, *Torenia*, *Tragopogon*, *Trollius*, *Tropaeolum*, *Tulipa*, *Tussilago*, *Ulex*, *Viola* oder *Zinnia* verwendet.

10

15

20

37. Verwendung der genetisch veränderten Organismen nach einem der Ansprüche 25 bis 36 als Futter- oder Nahrungsmittel.

25

38. Verwendung der genetisch veränderten Organismen nach einem der Ansprüche 25 bis 36 zur Herstellung von Ketocarotinoid-haltigen Extrakten oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungsergänzungsmittel.

30

39. Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 8 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 8 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 4 nicht enthalten ist.

35

40. Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abge-

leitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 6 aufweist.

- 5 41. Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 12 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 12 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 6 nicht enthalten ist.
- 10 42. Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 49 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 49 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 47 nicht enthalten ist.
- 15 43. Nukleinsäure, kodierend ein Protein gemäß einem der Ansprüche 39 bis 42, mit der Maßgabe, dass die Sequenz SEQ ID NO: 5 nicht enthalten ist.
- 20 44. Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 4 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.
- 25 45. Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 65 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 6 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.
- 30 46. Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 47 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 47 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.
- 35

## Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden in genetisch veränderten Organismen

### Zusammenfassung

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität aufweisen, die genetisch veränderten Organismen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von Ketocarotinoidextrakten.

10

Abbildung 1

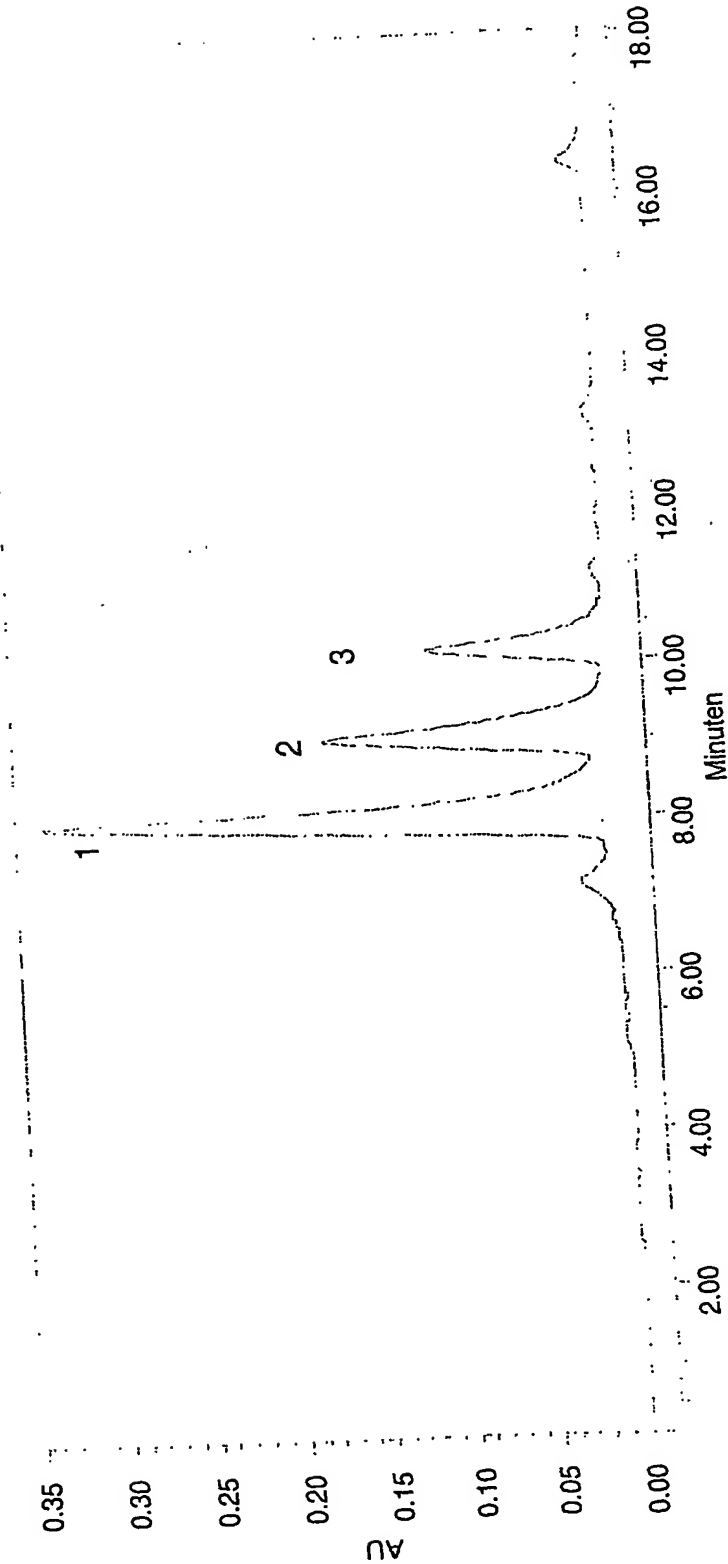
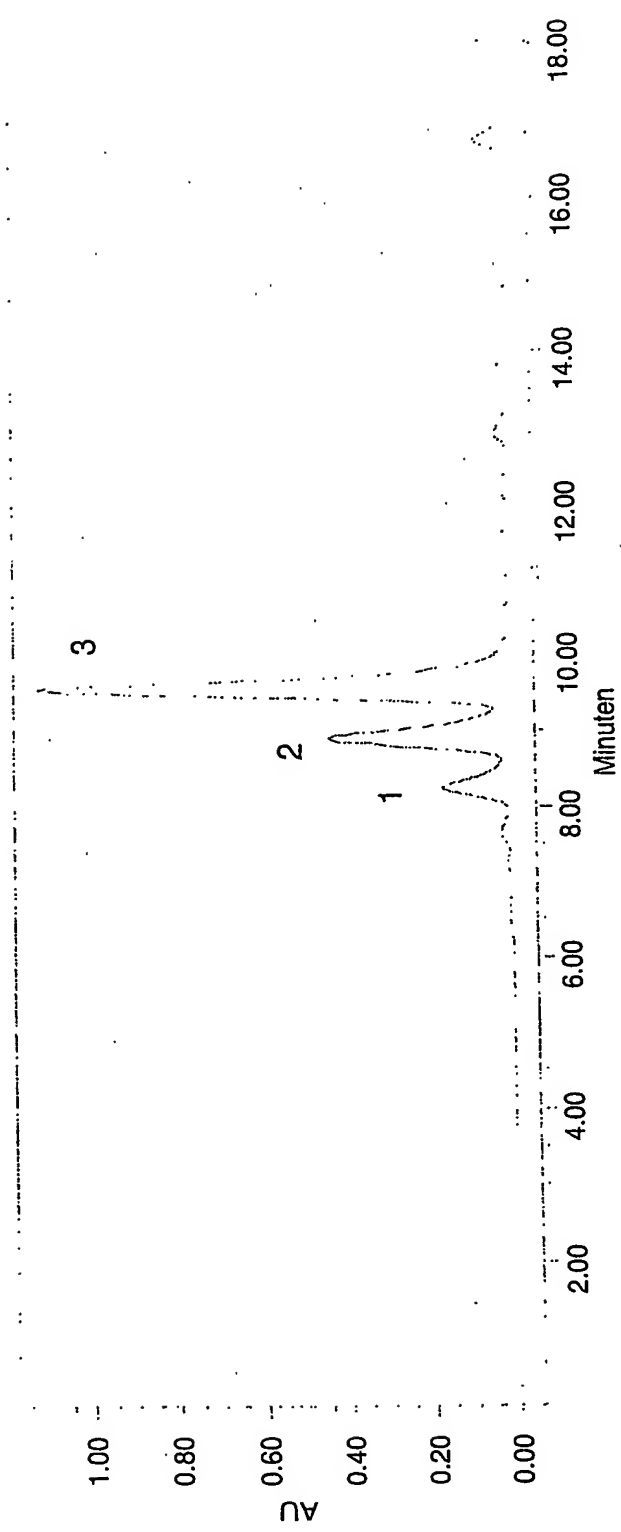


Abbildung 2



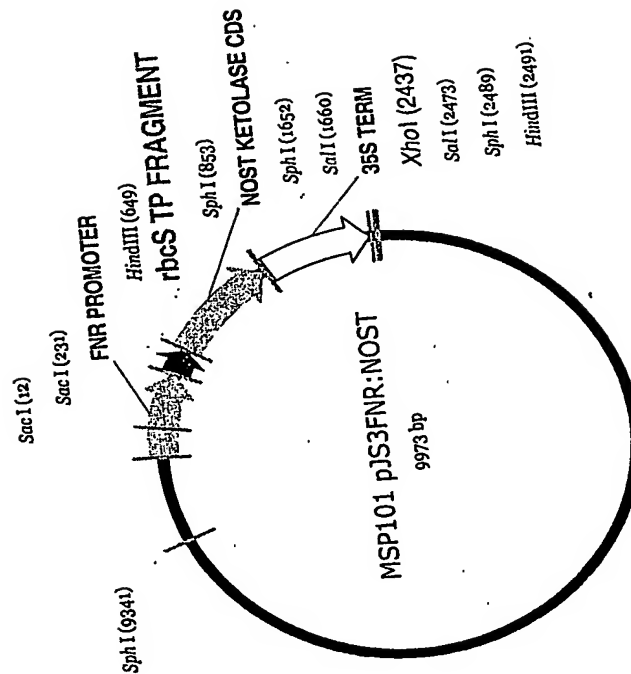
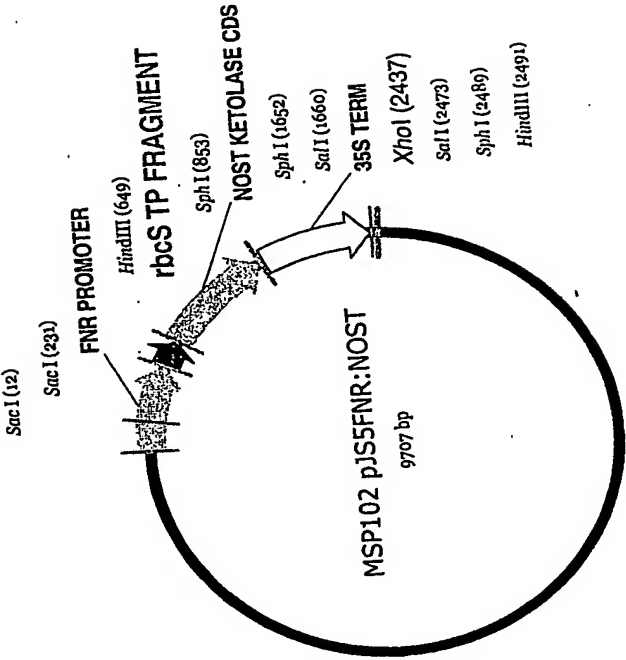


Abbildung 3

Abbildung 4





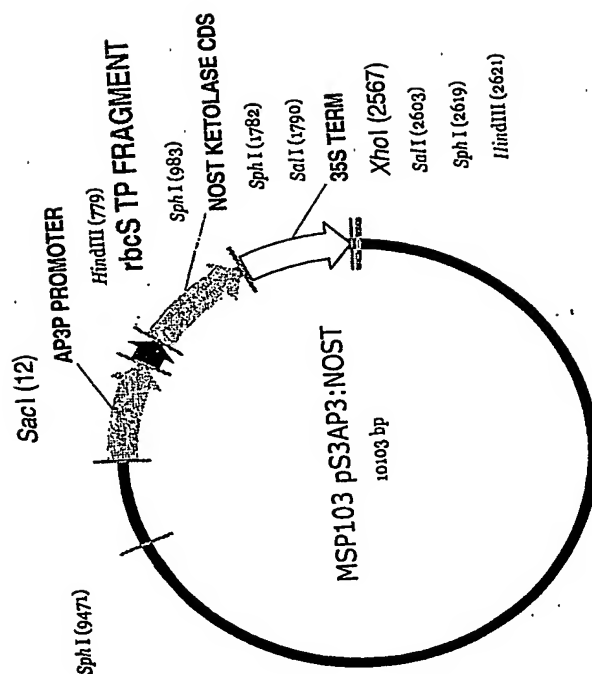


Abbildung 5

Abbildung 6

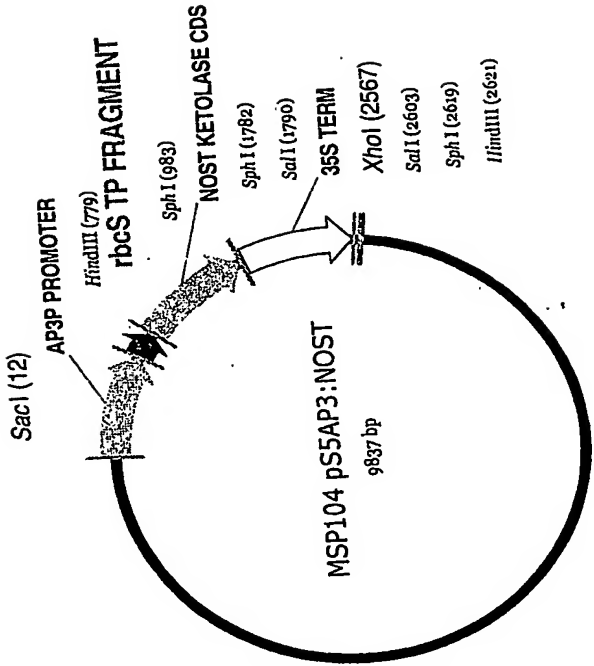
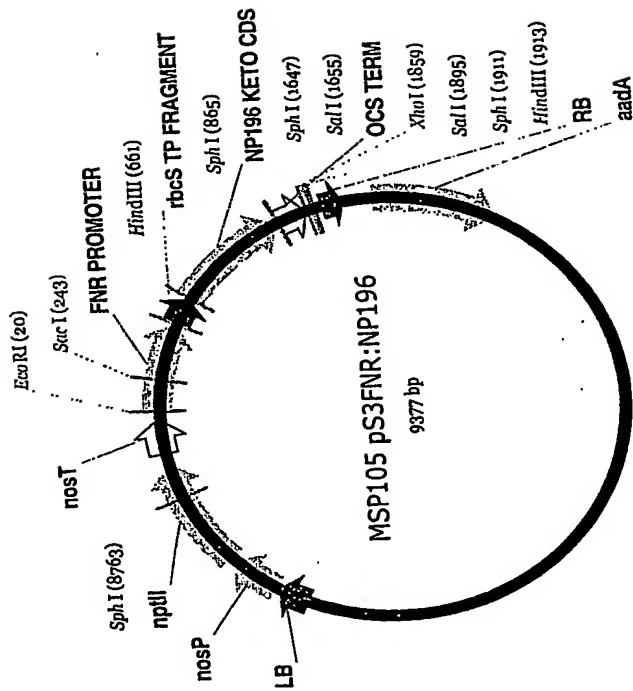


Abbildung 7



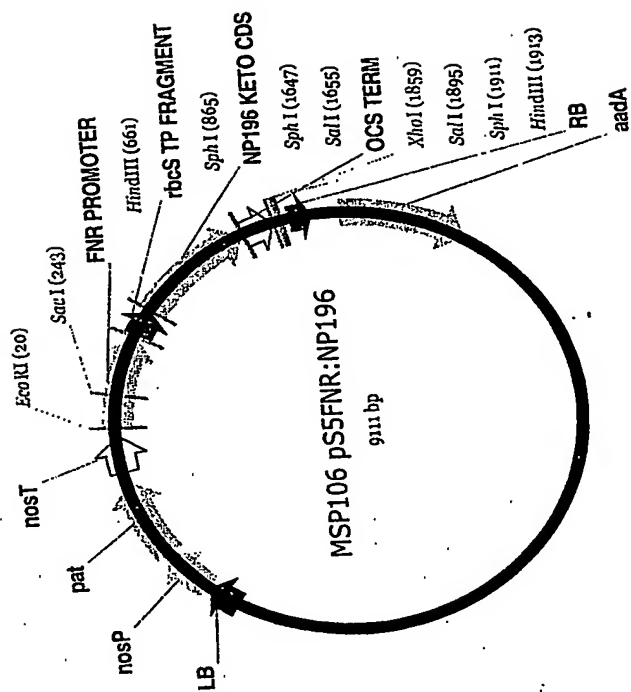


Abbildung 8

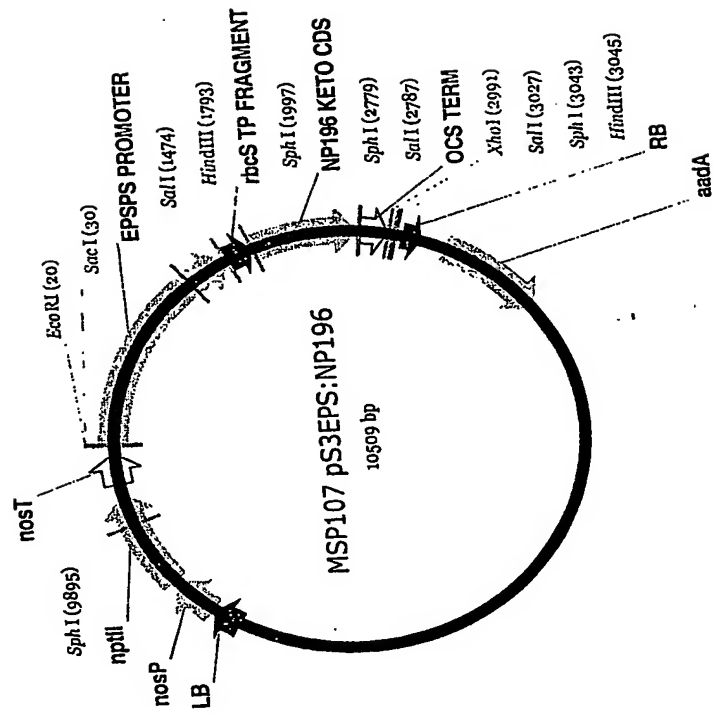


Abbildung 9

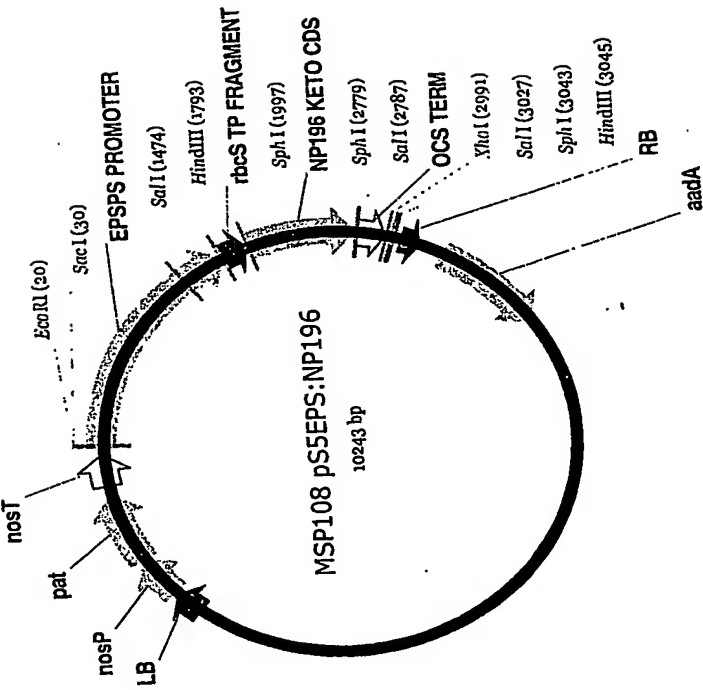
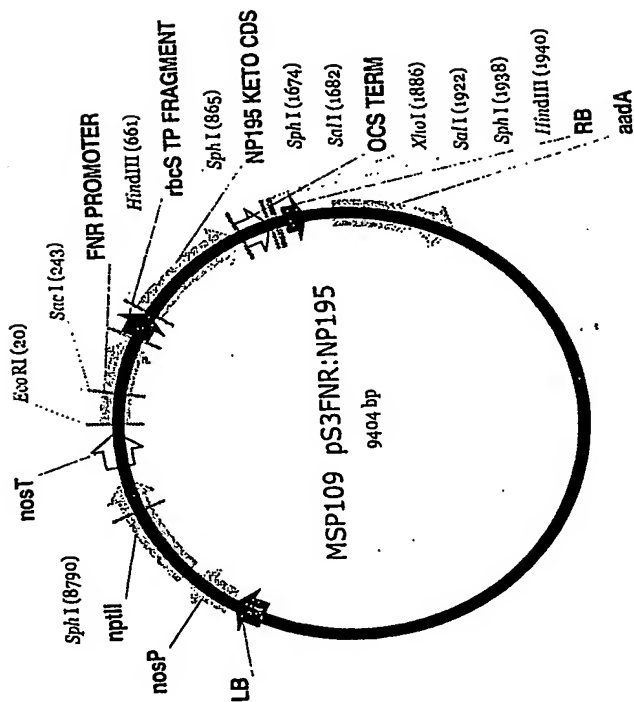


Abbildung 10

Abbildung 11



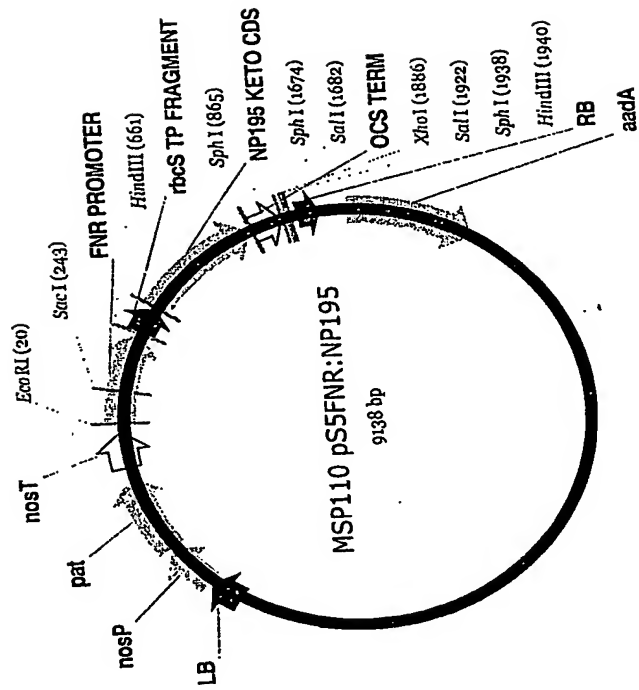


Abbildung 12



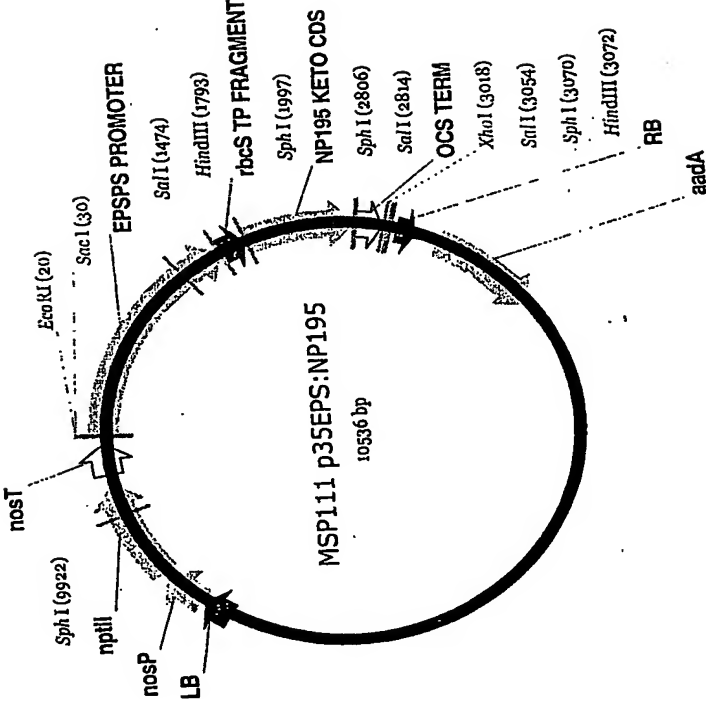


Abbildung 13

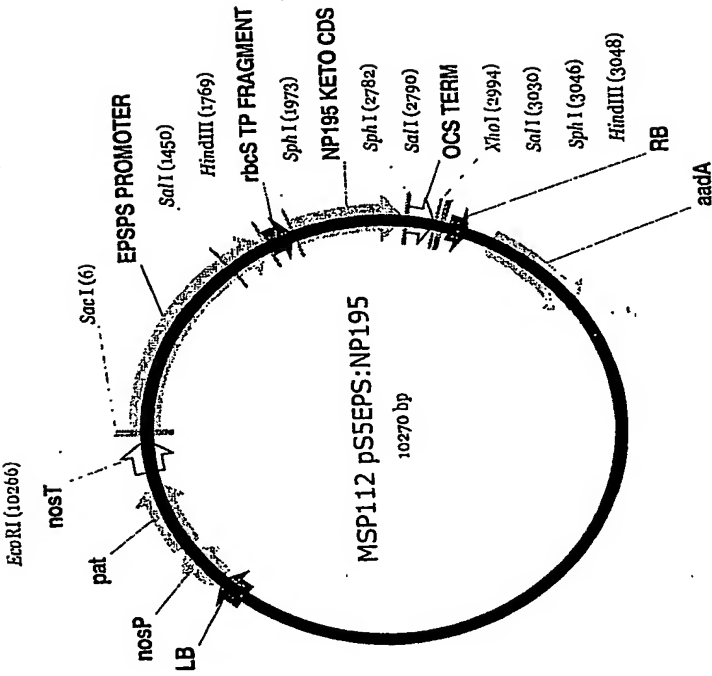


Abbildung 14

Abbildung 15

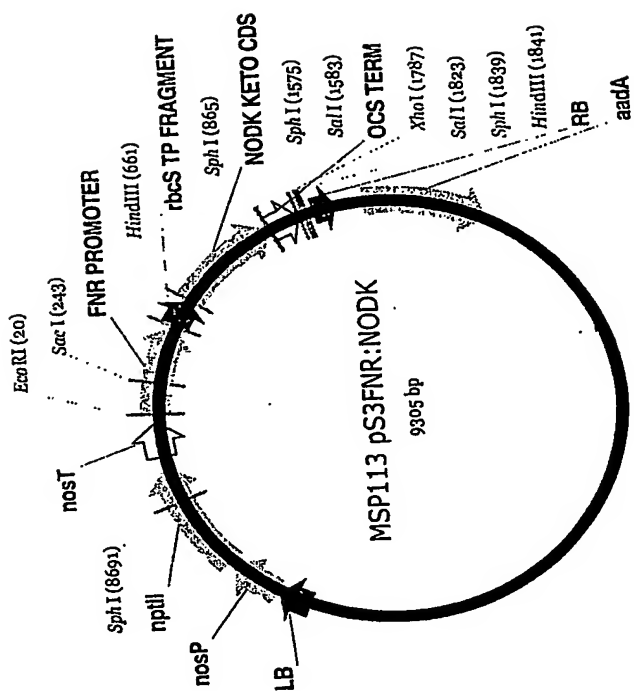
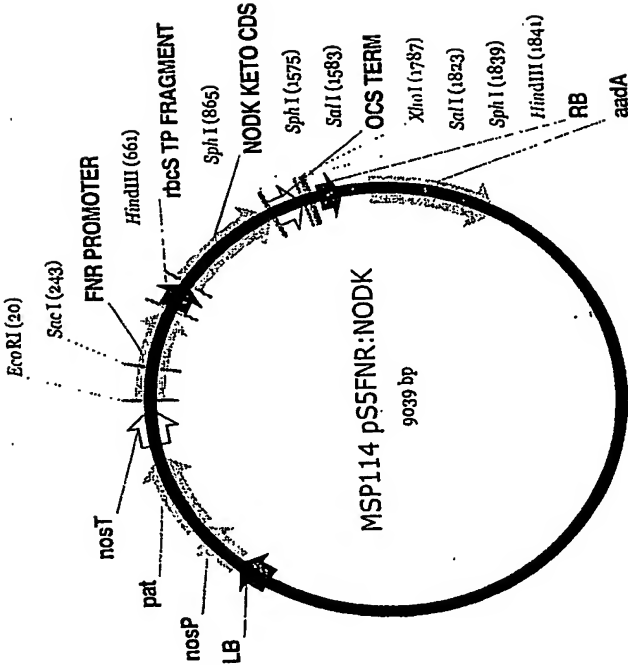


Abbildung 16



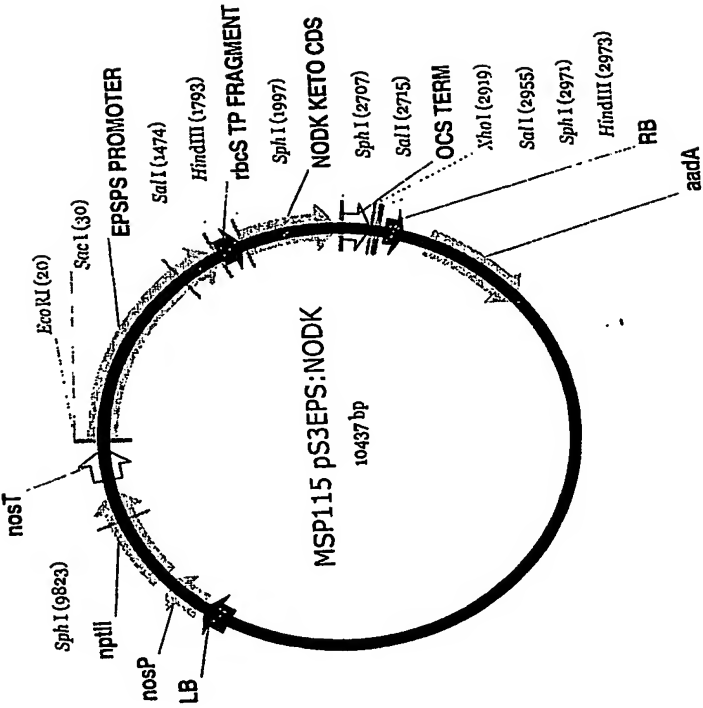
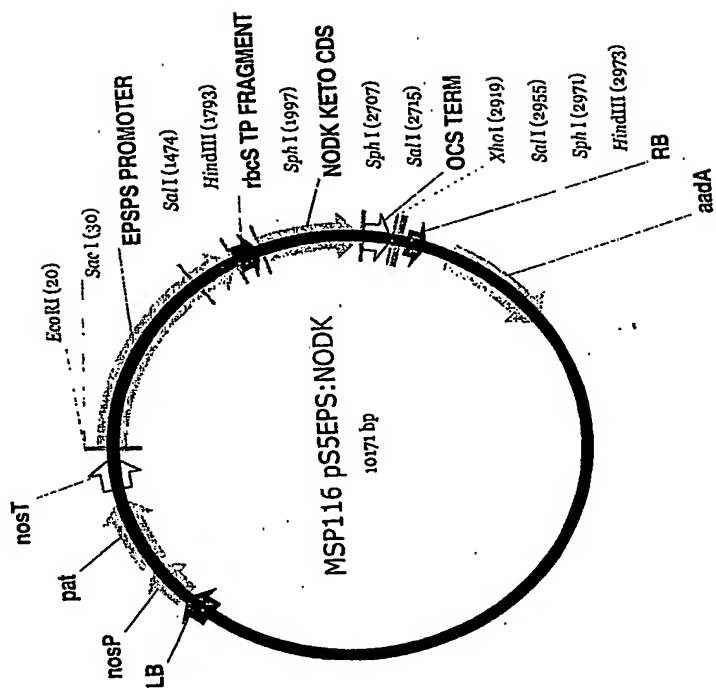


Abbildung 17

Abbildung 18



## SEQUENCE LISTING

5 <110> SunGene GmbH & Co. KGaA

10 <120> Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden in genetisch veränderten Organismen

15 <130> 20020636

<160> 74

20 <170> PatentIn version 3.1

25 <210> 1

<211> 777

30 <212> DNA

<213> Nostoc sp. Strain PCC7120

35 <220>

<221> CDS

40 <222> (1)..(777)

<223>

45 <400> 1 48

atg gtt cag tgt caa cca tca tct ctg cat tca gaa aaa ctg gtg tta  
Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu  
1 5 10 15

50 ttg tca tcg aca atc aga gat gat aaa aat att aat aag ggt ata ttt 96  
Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe  
20 25 30

55 att gcc tgc ttt atc tta ttt tta tgg gca att agt tta atc tta tta 144  
Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu  
35 40 45

60 ctc tca ata gat aca tcc ata att cat aag agc tta tta ggt ata gcc 192  
Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala  
50 55 60

65 atg ctt tgg cag acc ttc tta tat aca ggt tta ttt att act gct cat 240  
Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His  
65 70 75 80

gat gcc atg cac ggc gta gtt tat ccc aaa aat ccc aga ata aat aat 288  
Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn  
85 90 95

70

## 2

	ttt ata ggt aag ctc act cta atc ttg tat gga cta ctc cct tat aaa	336
	Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys	
	100 105 110	
5	gat tta ttg aaa aaa cat tgg tta cac cac gga cat cct ggt act gat	384
	Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp	
	115 120 125	
10	tta gac cct gat tat tac aat ggt cat ccc caa aac ttc ttt ctt tgg	432
	Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp	
	130 135 140	
15	tat cta cat ttt atg aag tct tat tgg cga tgg acg caa att ttc gga	480
	Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly	
	145 150 155 160	
20	tta gtg atg att ttt cat gga ctt aaa aat ctg gtg cat ata cca gaa	528
	Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu	
	165 170 175	
25	aat aat tta att ata ttt tgg atg ata cct tct att tta agt tca gta	576
	Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val	
	180 185 190	
30	caa cta ttt tat ttt ggt aca ttt ttg cct cat aaa aag cta gaa ggt	624
	Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly	
	195 200 205	
35	ggt tat act aac ccc cat tgt gcg cgc agt atc cca tta cct ctt ttt	672
	Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe	
	210 215 220	
40	tgg tct ttt gtt act tgt tat cac ttc ggc tac cac aag gaa cat cac	720
	Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His	
	225 230 235 240	
45	gaa tac cct caa ctt cct tgg tgg aaa tta cct gaa gct tac aaa ata	768
	Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile	
	245 250 255	
50	tct tta taa	777
	Ser Leu	
55	<210> 2	
	<211> 258	
60	<212> PRT	
	<213> Nostoc sp. Strain PCC7120	
65	<400> 2	
	Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu	
	1 5 10 15	
70	Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe	
	20 25 30	
	Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu	
	35 40 45	
	Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala	



50

55

60

5 Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His  
 65 70 75 80  
 10 Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn  
 85 90 95  
 15 Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys  
 100 105 110  
 20 Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp  
 115 120 125  
 25 Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp  
 130 135 140  
 30 Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly  
 145 150 155 160  
 35 Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu  
 165 170 175  
 40 Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val  
 180 185 190  
 45 Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly  
 195 200 205  
 50 Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe  
 210 215 220  
 55 Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His  
 225 230 235 240  
 60 Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile  
 245 250 255

Ser Leu

55

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 789

60

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Nostoc punctiforme

65

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

70

&lt;222&gt; (1)..(789)

&lt;223&gt;

5

&lt;400&gt; 3

10	1	ttg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat gtt gca ata gag caa	48
		Leu Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln	
		5 10 15	
		tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg gtg att gtc ata gta	96
		Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val	
		20 25 30	
15		att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt tta cta gct att aat	144
		Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Ala Ile Asn	
		35 40 45	
20		tat gcc aaa gtc cca att tgg ttg ata cct att gca ata gtt tgg caa	192
		Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln	
		50 55 60	
25		atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca cat gat gct atg cat	240
		Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His	
		65 70 75 80	
30		ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat aat ttt atc ggt tca	288
		Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser	
		85 90 95	
		cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat caa cag atg tta aag	336
		Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys	
		100 105 110	
35		aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc gaa gtt gac cca gat	384
		Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp	
		115 120 125	
40		ttt cat gat ggt aag aga aca aac gct att ttc tgg tat ctc cat ttc	432
		Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe	
		130 135 140	
45		atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata gta cta act atc cta	480
		Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu	
		145 150 155 160	
50		ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat caa ata aat ctc atc	528
		Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile	
		165 170 175	
55		tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc att caa ctg ttt tat	576
		Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr	
		180 185 190	
		ttc gga aca ttt ttg cct cat cga gaa ccc aag aaa gga tat gtt tat	624
		Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr	
		195 200 205	
60		ccc cat tgc agc caa aca ata aaa ttg cca act ttt ttg tca ttt atc	672
		Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile	
		210 215 220	
65		gct tgc tac cac ttt ggt tat cat gaa gaa cat cat gag tat ccc cat	720
		Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His	
		225 230 235 240	
70		gta cct tgg tgg caa ctt cca tct gta tat aag cag aga gta ttc aac	768
		Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn	
		245 250 255	

aat tca gta acc aat tcg taa  
 Asn Ser Val Thr Asn Ser  
 260

5

<210> 4

<211> 262

10

<212> PRT

<213> Nostoc punctiforme

15

<400> 4

20 Leu Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln  
 1 5 10 15

25

Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val  
 20 25 30

30

Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn  
 35 40 45

Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln  
 50 55 60

35

Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His  
 65 70 75 80

40

Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser  
 85 90 95

45

Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys  
 100 105 110

50

Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp  
 115 120 125

Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe  
 130 135 140

55

Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu  
 145 150 155 160

60

Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile  
 165 170 175

65

Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr  
 180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr  
 195 200 205

70

Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile  
 210 215 220

5

Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
 225 230 235 240

10 Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn  
 245 250 255

15 Asn Ser Val Thr Asn Ser  
 260

<210> 5

20 <211> 762

<212> DNA

25 <213> Nostoc punctiforme

<220>

30 <221> CDS

<222> (1)..(762)

35 <223>

<400> 5

40 gtg atc cag tta gaa caa cca ctc agt cat caa gca aaa ctg act cca 48  
 Val Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro  
 1 5 10 15

45 gta ctg aga agt aaa tct cag ttt aag ggg ctt ttc att gct att gtc 96  
 Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val  
 20 25 30

50 att gtt agc gca tgg gtc att agc ctg agt tta tta ctt tcc ctt gac 144  
 Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Ser Leu Asp  
 35 40 45

55 atc tca aag cta aaa ttt tgg atg tta ttg cct gtt ata cta tgg caa 192  
 Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln  
 50 55 60

60 aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca tct cat gat gcc atg cat 240  
 Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His  
 65 70 75 80

65 ggc gta gta ttt ccc caa aac acc aag att aat cat ttg att gga aca 288  
 Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr  
 85 90 95

70 ttg acc cta tcc ctt tat ggt ctt tta cca tat caa aaa cta ttg aaa 336  
 Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys  
 100 105 110

aaa cat tgg tta cac cac cac aat cca gca agc tca ata gac ccg gat 384  
 Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp

115 120 125

	ttt	cac	aat	ggt	aaa	cac	caa	agt	ttc	ttt	gct	tgg	tat	ttt	cat	ttt	432
	Phe	His	Asn	Gly	Lys	His	Gln	Ser	Phe	Phe	Ala	Trp	Tyr	Phe	His	Phe	
	130						135					140					
5	atg	aaa	ggt	tac	tgg	agt	tgg	ggg	caa	ata	att	gcg	ttg	act	att	att	480
	Met	Lys	Gly	Tyr	Trp	Ser	Trp	Gly	Gln	Ile	Ile	Ala	Leu	Thr	Ile	Ile	
	145					150					155					160	
10	tat	aac	ttt	gct	aaa	tac	ata	ctc	cat	atc	cca	agt	gat	aat	cta	act	528
	Tyr	Asn	Phe	Ala	Lys	Tyr	Ile	Leu	His	Ile	Pro	Ser	Asp	Asn	Leu	Thr	
					165					170					175		
15	tac	ttt	tgg	gtg	cta	ccc	tgc	ctt	tta	agt	tca	tta	caa	tta	ttc	tat	576
	Tyr	Phe	Trp	Val	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Gln	Leu	Phe	Tyr	
				180					185					190			
20	ttt	ggt	act	ttt	tta	ccc	cat	agt	gaa	cca	ata	ggg	ggt	tat	gtt	cag	624
	Phe	Gly	Thr	Phe	Leu	Pro	His	Ser	Glu	Pro	Ile	Gly	Gly	Tyr	Val	Gln	
			195					200					205				
	cct	cat	tgt	gcc	caa	aca	att	agc	cgt	cct	att	tgg	tgg	tca	ttt	atc	672
	Pro	His	Cys	Ala	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg	Pro	Ile	Trp	Trp	Ser	Phe	Ile	
			210				215					220					
	acg	tgc	tat	cat	ttt	ggc	tac	cac	gag	gaa	cat	cac	gaa	tat	cct	cat	720
	Thr	Cys	Tyr	His	Phe	Gly	Tyr	His	Glu	Glu	His	His	Glu	Tyr	Pro	His	
						230				235						240	
30	att	tct	tgg	tgg	cag	tta	cca	gaa	att	tac	aaa	gca	aaa	tag			762
	Ile	Ser	Trp	Trp	Gln	Leu	Pro	Glu	Ile	Tyr	Lys	Ala	Lys				
					245					250							
35	<210>	6															
	<211>	253															
40	<212>	PRT															
	<213>	Nostoc punctiforme															
45	<400>	6															
	Val	Ile	Gln	Leu	Glu	Gln	Pro	Leu	Ser	His	Gln	Ala	Lys	Leu	Thr	Pro	
	1				5					10					15		
50	Val	Leu	Arg	Ser	Lys	Ser	Gln	Phe	Lys	Gly	Leu	Phe	Ile	Ala	Ile	Val	
				20					25					30			
55	Ile	Val	Ser	Ala	Trp	Val	Ile	Ser	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Asp	
			35					40					45				
60	Ile	Ser	Lys	Leu	Lys	Phe	Trp	Met	Leu	Leu	Pro	Val	Ile	Leu	Trp	Gln	
		50					55					60					
65	Thr	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Ser	His	Asp	Ala	Met	His	
	65					70				75						80	
70	Gly	Val	Val	Phe													

5 Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys  
 100 105 110  
 Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp  
 115 120 125  
 10 Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe  
 130 135 140  
 15 Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile  
 145 150 155 160  
 20 Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr  
 165 170 175  
 25 Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr  
 180 185 190  
 Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln  
 195 200 205  
 30 Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile  
 210 215 220  
 35 Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
 225 230 235 240  
 40 Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys  
 245 250  
 <210> 7  
 45 <211> 789  
 <212> DNA  
 50 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 55 <221> CDS  
 <222> (1)..(789)  
 60 <223>  
 <400> 7  
 65 atg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat gtt gca ata gag caa 48  
 Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln  
 1 5 10 15  
 tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg gtg att gtc ata gta 96  
 Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val  
 20 25 30  
 70

	att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt tta cta gct att aat	144
	Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn	
	35 40 45	
5	tat gcc aaa att cat aag tgg ttg ata cct att gca ata gtt tgg caa	192
	Tyr Ala Lys Ile His Lys Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln	
	50 55 60	
10	atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca cat gat gct atg cat	240
	Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His	
	65 70 75 80	
15	ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat aat ttt atc ggt tca	288
	Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser	
	85 90 95	
20	cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat caa cag atg tta aag	336
	Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys	
	100 105 110	
25	aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc gaa gtt gac cca gat	384
	Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp	
	115 120 125	
30	ttt cat gat ggt aag aga aca aac gct att ttc tgg tat ctc cat ttc	432
	Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe	
	130 135 140	
35	atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata gta cta act atc cta	480
	Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu	
	145 150 155 160	
40	ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat caa ata aat ctc atc	528
	Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile	
	165 170 175	
45	tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc att caa ctg ttt tat	576
	Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr	
	180 185 190	
50	ttc gga aca ttt ttg cct cat cga gaa ccc aag aaa gga tat gtt tat	624
	Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr	
	195 200 205	
55	ccc cat tgc agc caa aca ata aaa ttg cca act ttt ttg tca ttt atc	672
	Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile	
	210 215 220	
60	gct tgc tac cac ttt ggt tat cat gaa gaa cat cat gag tat ccc cat	720
	Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His	
	225 230 235 240	
65	gta cct tgg tgg caa ctt cca tct gta tat aag cag aga gta ttc aac	768
	Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn	
	245 250 255	
70	aat tca gta acc aat tcg taa	789
	Asn Ser Val Thr Asn Ser	
	260	
	<210> 8	
	<211> 262	
	<212> PRT	
	<213> Künstliche Sequenz	

&lt;400&gt; 8

5 Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln  
 1 5 10 15  
 10 Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val  
 20 25 30  
 15 Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn  
 35 40 45  
 20 Tyr Ala Lys Ile His Lys Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln  
 50 55 60  
 25 Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His  
 65 70 75 80  
 30 Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser  
 85 90 95  
 35 Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys  
 100 105 110  
 40 Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp  
 115 120 125  
 45 Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe  
 130 135 140  
 50 Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu  
 145 150 155 160  
 55 Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile  
 165 170 175  
 60 Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr  
 180 185 190  
 65 Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr  
 195 200 205  
 70 Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile  
 210 215 220  
 Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
 225 230 235 240  
 65 Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn  
 245 250 255  
 70 Asn Ser Val Thr Asn Ser  
 260



<210> 9  
 5 <211> 789  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 10  
 <220>  
 15 <221> CDS  
 <222> (1)..(789)  
 <223>  
 20  
 <400> 9  
 25 atg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat gtt gca ata gag caa 48  
 Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln  
 1 5 10 15  
 tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg gtg att gtc ata gta 96  
 Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val  
 20 25 30  
 att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt tta cta gct att aat 144  
 Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn  
 35 35 40 45  
 tat gcc aaa gtc cca att tgg ttg ata cct att gca ata gtt tgg caa 192  
 Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln  
 50 55 60  
 40 atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca cat gat gct atg cat 240  
 Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His  
 65 70 75 80  
 45 ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat aat ttt atc ggt tca 288  
 Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser  
 85 90 95  
 50 cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat caa cag atg tta aag 336  
 Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys  
 100 105 110  
 aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc gat tta gac cca gat 384  
 Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Asp Leu Asp Pro Asp  
 115 120 125  
 55 ttt cat gat ggt aag aga aca aac gct att ttc tgg tat ctc cat ttc 432  
 Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe  
 130 135 140  
 60 atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata gta cta act atc cta 480  
 Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu  
 145 150 155 160  
 65 ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat caa ata aat ctc atc 528  
 Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile  
 165 170 175  
 70 tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc att caa ctg ttt tat 576  
 Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr  
 180 185 190

ttc gga aca ttt ttg cct cat cga gaa ccc aag aaa gga tat gtt tat 624  
 Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr  
 195 200 205  
 5 ccc cat tgc agc caa aca ata aaa ttg cca act ttt ttg tca ttt atc 672  
 Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile  
 210 215 220  
 10 gct tgc tac cac ttt ggt tat cat gaa gaa cat cat gag tat ccc cat 720  
 Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
 225 230 235 240  
 15 gta cct tgg tgg caa ctt cca tct gta tat aag cag aga gta ttc aac 768  
 Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn  
 245 250 255  
 aat tca gta acc aat tgc taa 789  
 Asn Ser Val Thr Asn Ser  
 20 260  
 <210> 10  
 25 <211> 262  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz  
 30  
 <400> 10  
 35 Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln  
 1 5 10 15  
 40 Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val  
 20 25 30  
 Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn  
 35 40 45  
 45 Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln  
 50 55 60  
 50 Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His  
 65 70 75 80  
 55 Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser  
 85 90 95  
 60 Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys  
 100 105 110  
 Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Asp Leu Asp Pro Asp  
 115 120 125  
 65 Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe  
 130 135 140  
 70

## 13

Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu  
 145 150 155 160

5 Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile  
 165 170 175

10 Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr  
 180 185 190

15 Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr  
 195 200 205

20 Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile  
 210 215 220

25 Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
 225 230 235 240

Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn  
 245 250 255

30 Asn Ser Val Thr Asn Ser  
 260

<210> 11

35 <211> 762

<212> DNA

40 <213> Künstliche Sequenz

<220>

45 <221> CDS

<222> (1) .. (762)

50 <223>

<400> 11

55 atg atc cag tta gaa caa cca ctc agt cat caa gca aaa ctg act cca 48  
 Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro  
 1 5 10 15

gta ctg aga agt aaa tct cag ttt aag ggg ctt ttc att gct att gtc 96  
 Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val  
 20 25 30

60 att gtt agc gca tgg gtc att agc ctg agt tta tta ctt tcc ctt gac 144  
 Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Ser Leu Asp  
 35 40 45

65 atc tca aag att cat aag tgg atg tta ttg cct gtt ata cta tgg caa 192  
 Ile Ser Lys Ile His Lys Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln  
 50 55 60

70 aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca tct cat gat gcc atg cat 240

## 14

	Thr	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Ser	His	Asp	Ala	Met	His	
	65					70				75						80	
5	ggc	gta	gta	ttt	ccc	caa	aac	acc	aag	att	aat	cat	ttg	att	gga	aca	288
	Gly	Val	Val	Phe	Pro	Gln	Asn	Thr	Lys	Ile	Asn	His	Leu	Ile	Gly	Thr	
					85					90					95		
10	ttg	acc	cta	tcc	ctt	tat	ggt	ctt	tta	cca	tat	caa	aaa	cta	ttg	aaa	336
	Leu	Thr	Leu	Ser	Leu	Tyr	Gly	Leu	Leu	Pro	Tyr	Gln	Lys	Leu	Leu	Lys	
				100					105					110			
15	aaa	cat	tgg	tta	cac	cac	cac	aat	cca	gca	agc	tca	ata	gac	ccg	gat	384
	Lys	His	Trp	Leu	His	His	His	Asn	Pro	Ala	Ser	Ser	Ile	Asp	Pro	Asp	
			115					120					125				
20	ttt	cac	aat	ggt	aaa	cac	caa	agt	ttc	ttt	gct	tgg	tat	ttt	cat	ttt	432
	Phe	His	Asn	Gly	Lys	His	Gln	Ser	Phe	Phe	Ala	Trp	Tyr	Phe	His	Phe	
			130				135					140					
25	atg	aaa	ggt	tac	tgg	agt	tgg	ggg	caa	ata	att	gcg	ttg	act	att	att	480
	Met	Lys	Gly	Tyr	Trp	Ser	Trp	Gly	Gln	Ile	Ile	Ala	Leu	Thr	Ile	Ile	
						150				155					160		
30	tat	aac	ttt	gct	aaa	tac	ata	ctc	cat	atc	cca	agt	gat	aat	cta	act	528
	Tyr	Asn	Phe	Ala	Lys	Tyr	Ile	Leu	His	Ile	Pro	Ser	Asp	Asn	Leu	Thr	
					165					170					175		
35	tac	ttt	tgg	gtg	cta	ccc	tcg	ctt	tta	agt	tca	tta	caa	tta	ttc	tat	576
	Tyr	Phe	Trp	Val	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Gln	Leu	Phe	Tyr	
				180					185					190			
40	ttt	ggt	act	ttt	tta	ccc	cat	agt	gaa	cca	ata	ggg	ggt	tat	ggt	cag	624
	Phe	Gly	Thr	Phe	Leu	Pro	His	Ser	Glu	Pro	Ile	Gly	Gly	Tyr	Val	Gln	
			195					200					205				
45	cct	cat	tgt	gcc	caa	aca	att	agc	cgt	cct	att	tgg	tgg	tca	ttt	atc	672
	Pro	His	Cys	Ala	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg	Pro	Ile	Trp	Trp	Ser	Phe	Ile	
				210			215					220					
50	acg	tgc	tat	cat	ttt	ggc	tac	cac	gag	gaa	cat	cac	gaa	tat	cct	cat	720
	Thr	Cys	Tyr	His	Phe	Gly	Tyr	His	Glu	Glu	His	His	Glu	Tyr	Pro	His	
						230					235				240		
55	att	tct	tgg	tgg	cag	tta	cca	gaa	att	tac	aaa	gca	aaa	tag			762
	Ile	Ser	Trp	Trp	Gln	Leu	Pro	Glu	Ile	Tyr	Lys	Ala	Lys				
					245				250								
60	<210>	12															
	<211>	253															
	<212>	PRT															
65	<213>	Künstliche Sequenz															
70	<400>	12															
	Met	Ile	Gln	Leu	Glu	Gln	Pro	Leu	Ser	His	Gln	Ala	Lys	Leu	Thr	Pro	
	1				5					10				15			
65	Val	Leu	Arg	Ser	Lys	Ser	Gln	Phe	Lys	Gly	Leu	Phe	Ile	Ala	Ile	Val	
				20					25					30			
70	Ile	Val	Ser	Ala	Trp	Val	Ile	Ser	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Asp	
			35				40						45				

5 Ile Ser Lys Ile His Lys Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln  
 50 55 60  
 Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His  
 65 70 75 80  
 10 Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr  
 85 90 95  
 15 Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys  
 100 105 110  
 20 Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp  
 115 120 125  
 Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe  
 130 135 140  
 25 Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile  
 145 150 155 160  
 30 Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr  
 165 170 175  
 35 Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr  
 180 185 190  
 40 Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln  
 195 200 205  
 Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile  
 210 215 220  
 45 Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
 225 230 235 240  
 50 Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys  
 245 250  
 55 <210> 13  
 <211> 762  
 <212> DNA  
 60 <213> Künstliche Sequenz  
 65 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(762)  
 70

&lt;223&gt;

5 <400> 13  
 atg atc cag tta gaa caa cca ctc agt cat caa gca aaa ctg act cca 48  
 Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro  
 1 5 10 15  
 10 gta ctg aga agt aaa tct cag ttt aag ggg ctt ttc att gct att gtc 96  
 Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val  
 20 25 30  
 15 att gtt agc gca tgg gtc att agc ctg agt tta tta ctt tcc ctt gac 144  
 Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Leu Ser Leu Asp  
 35 40 45  
 20 atc tca aag cta aaa ttt tgg atg tta ttg cct gtt ata cta tgg caa 192  
 Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln  
 50 55 60  
 25 aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca tct cat gat gcc atg cat 240  
 Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His  
 65 70 75 80  
 30 ggc gta gta ttt ccc caa aac acc aag att aat cat ttg att gga aca 288  
 Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr  
 85 90 95  
 35 ttg acc cta tcc ctt tat ggt ctt tta cca tat caa aaa cta ttg aaa 336  
 Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys  
 100 105 110  
 40 aaa cat tgg tta cac cac cac aat cca gca agc gat tta gac ccg gat 384  
 Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Asp Leu Asp Pro Asp  
 115 120 125  
 45 ttt cac aat ggt aaa cac caa agt ttc ttt gct tgg tat ttt cat ttt 432  
 Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe  
 130 135 140  
 50 atg aaa ggt tac tgg agt tgg ggg caa ata att gcg ttg act att att 480  
 Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile  
 145 150 155 160  
 55 tat aac ttt gct aaa tac ata ctc cat atc cca agt gat aat cta act 528  
 Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr  
 165 170 175  
 60 tac ttt tgg gtg cta ccc tgg ctt tta agt tca tta caa tta ttc tat 576  
 Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr  
 180 185 190  
 65 ttt ggt act ttt tta ccc cat agt gaa cca ata ggg ggt tat gtt cag 624  
 Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln  
 195 200 205  
 70 cct cat tgt gcc caa aca att agc cgt cct att tgg tgg tca ttt atc 672  
 Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile  
 210 215 220  
 75 acg tgc tat cat ttt ggc tac cac gag gaa cat cac gaa tat cct cat 720  
 Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
 225 230 235 240  
 80 att tct tgg tgg cag tta cca gaa att tac aaa gca aaa tag 762  
 Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys  
 245 250

<210> 14  
 <211> 253  
 5 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

10 <400> 14  
 Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro  
 1 5 10 15  
 15 Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val  
 20 25 30  
 20 Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Leu Ser Leu Asp  
 35 40 45  
 5 Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln  
 50 55 60  
 30 Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His  
 65 70 75 80  
 Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr  
 85 90 95  
 35 Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys  
 100 105 110  
 40 Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Asp Leu Asp Pro Asp  
 115 120 125  
 45 Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe  
 130 135 140  
 50 Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile  
 145 150 155 160  
 Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr  
 165 170 175  
 55 Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr  
 180 185 190  
 60 Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln  
 195 200 205  
 65 Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile  
 210 215 220  
 70 Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
 225 230 235 240

Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys  
 245 250

5

<210> 15

<211> 1608

10

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

15

<220>

<221> CDS

20

<222> (3)...(971).

<223>

25

<400> 15

ct aca ttt cac aag ccc gtg agc ggt gca agc gct ctg ccc cac atc 47  
 Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile  
 1 5 10 15

30

ggc cca cct cct cat ctc cat cgg tca ttt gct gct acc acg atg ctg 95  
 Gly Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu  
 20 25 30

35

tcg aag ctg cag tca atc agc gtc aag gcc cgc cgc gtt gaa cta gcc 143  
 Ser Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala  
 35 40 45

40

cgc gac atc acg cgg ccc aaa gtc tgc ctg cat gct cag cgg tgc tcg 191  
 Arg Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser  
 50 55 60

45

tta gtt cgg ctg cga gtg gca gca cca cag aca gag gag gcg ctg gga 239  
 Leu Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly  
 65 70 75

50

acc gtg cag gct gcc ggc gcg ggc gat gag cac agc gcc gat gta gca 287  
 Thr Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala  
 80 85 90 95

55

ctc cag cag ctt gac cgg gct atc gca gag cgt cgt gcc cgg cgc aaa 335  
 Leu Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys  
 100 105 110

cgg gag cag ctg tca tac cag gct gcc gcc att gca gca tca att ggc 383  
 Arg Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly  
 115 120 125

60

gtg tca ggc att gcc atc ttc gcc acc tac ctg aga ttt gcc atg cac 431  
 Val Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His  
 130 135 140

65

atg acc gtg ggc ggc gca gtg cca tgg ggt gaa gtg gct ggc act ctc 479  
 Met Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu  
 145 150 155

70

ctc ttg gtg gtt ggt ggc gcg ctc ggc atg gag atg tat gcc cgc tat 527  
 Leu Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr  
 160 165 170 175



	gca cac aaa gcc atc tgg cat gag tgc cct ctg ggc tgg ctg ctg cac	575
	Ala His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His	
	180 185 190	
5	aag agc cac cac aca cct cgc act gga ccc ttt gaa gcc aac gac ttg	623
	Lys Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu	
	195 200 205	
10	ttt gca atc atc aat gga ctg ccc gcc atg ctc ctg tgt acc ttt ggc	671
	Phe Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly	
	210 215 220	
15	ttc tgg ctg ccc aac gtc ctg ggg gcg gcc tgc ttt gga gcg ggg ctg	719
	Phe Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu	
	225 230 235	
20	ggc atc acg cta tac ggc atg gca tat atg ttt gta cac gat ggc ctg	767
	Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu	
	240 245 250 255	
	gtg cac agg cgc ttt ccc acc ggg ccc atc gct ggc ctg ccc tac atg	815
	Val His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met	
	260 265 270	
25	aag cgc ctg aca gtg gcc cac cag cta cac cac agc ggc aag tac ggt	863
	Lys Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly	
	275 280 285	
30	ggc gcg ccc tgg ggt atg ttc ttg ggt cca cag gag ctg cag cac att	911
	Gly Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile	
	290 295 300	
35	cca ggt gcg gcg gag gag gtg gag cga ctg gtc ctg gaa ctg gac tgg	959
	Pro Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp	
	305 310 315	
40	tcc aag cgg tag ggtgcggaac caggcacgct ggtttcacac ctcatgcctg	1011
	Ser Lys Arg	
	320	
	tgataagggtg tggctagagc gatgcgtgtg agacgggtat gtcacgggtcg actggtctga	1071
45	tggccaatgg catcgcccat gtctggtcat cacgggctgg ttgcctgggt gaagggtgatg	1131
	cacatcatca tgtgcggttg gaggggctgg cacagtgtgg gctgaactgg agcagttgtc	1191
	caggctggcg ttgaatcagt gagggtttgt gattggcgggt tgtgaagcaa tgactccgcc	1251
50	catattctat ttgtgggagc tgagatgatg gcatgcttgg gatgtgcatg gatcatggta	1311
	gtgcagcaaa ctatattcac ctagggtgtg ttgtaggatc aggtgaggcc ttgcacattg	1371
55	catgatgtac tcgtcatggt gtgttggtga gaggatggat gtggatggat gtgtattctc	1431
	agacgtagac cttgactgga ggcttgatcg agagagtggg ccgtattctt tgagagggga	1491
	ggctcgtgcc agaaatggtg agtggatgac tgtgacgctg tacattgcag gcagggtgaga	1551
60	tgcactgtct cgattgtaaa atacattcag atgcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa	1608
	<210> 16	
65	<211> 322	
	<212> PRT	
70	<213> Haematococcus pluvialis	

&lt;400&gt; 16

5 Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile Gly  
 1 5 10 15  
 10 Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu Ser  
 20 25 30  
 15 Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala Arg  
 35 40 45  
 20 Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser Leu  
 50 55 60  
 25 Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly Thr  
 65 70 75 80  
 30 Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala Leu  
 85 90 95  
 35 Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys Arg  
 100 105 110  
 40 Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly Val  
 115 120 125  
 45 Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His Met  
 130 135 140  
 50 Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu Leu  
 145 150 155 160  
 55 Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr Ala  
 165 170 175  
 60 His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His Lys  
 180 185 190  
 65 Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu Phe  
 195 200 205  
 70 Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly Phe  
 210 215 220  
 75 Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu Gly  
 225 230 235 240  
 80 Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu Val  
 245 250 255  
 85 His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met Lys  
 260 265 270

5 Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly Gly  
 275 280 285  
 10 Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile Pro  
 290 295 300  
 15 Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp Ser  
 305 310 315 320  
 20 <210> 17  
 <211> 1650  
 <212> DNA  
 25 <213> Lycopersicon esculentum  
 30 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (112)..(1614)  
 35 <223>  
 40 <400> 17  
 ggcacgagga aacttttctc tcttcactag ctgtttacat gcttgaaatt tcaagatttt 60  
 aggaccccat ttgaagtttt cttgaaacaa atattaccct gttggaaaaa g atg gat 117  
 Met Asp  
 1  
 45 act ttg ttg aaa acc cca aat aac ctt gaa ttt ctg aac cca cat cat 165  
 Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro His His  
 5 10 15  
 50 ggt ttt gct gtt aaa gct agt acc ttt aga tct gag aag cat cat aat 213  
 Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His His Asn  
 20 25 30  
 55 ttt ggt tct agg aag ttt tgt gaa act ttg ggt aga agt gtt tgt gtt 261  
 Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val Cys Val  
 35 40 45 50  
 60 aag ggt agt agt agt gct ctt tta gag ctt gta cct gag acc aaa aag 309  
 Lys Gly Ser Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr Lys Lys  
 55 60 65  
 65 gag aat ctt gat ttt gag ctt cct atg tat gac cct tca aaa ggg gtt 357  
 Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys Gly Val  
 70 75 80  
 70 gtt gtg gat ctt gct gtg gtt ggt ggt ggc cct gca gga ctt gct gtt 405  
 Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu Ala Val  
 85 90 95  
 gca cag caa gtt tct gaa gca gga ctc tct gtt tgt tca att gat ccg 453

## 22

	Ala	Gln	Gln	Val	Ser	Glu	Ala	Gly	Leu	Ser	Val	Cys	Ser	Ile	Asp	Pro	
	100						105					110					
5	aat	cct	aaa	ttg	ata	tgg	cct	aat	aac	tat	ggg	gtt	tgg	gtg	gat	gaa	501
	Asn	Pro	Lys	Leu	Ile	Trp	Pro	Asn	Asn	Tyr	Gly	Val	Trp	Val	Asp	Glu	
	115					120					125					130	
10	ttt	gag	gct	atg	gac	ttg	tta	gat	tgt	cta	gat	gct	acc	tgg	tct	ggg	549
	Phe	Glu	Ala	Met	Asp	Leu	Leu	Asp	Cys	Leu	Asp	Ala	Thr	Trp	Ser	Gly	
					135					140					145		
15	gca	gca	gtg	tac	att	gat	gat	aat	acg	gct	aaa	gat	ctt	cat	aga	cct	597
	Ala	Ala	Val	Tyr	Ile	Asp	Asp	Asn	Thr	Ala	Lys	Asp	Leu	His	Arg	Pro	
				150					155					160			
20	tat	gga	agg	gtt	aac	cgg	aaa	cag	ctg	aaa	tcg	aaa	atg	atg	cag	aaa	645
	Tyr	Gly	Arg	Val	Asn	Arg	Lys	Gln	Leu	Lys	Ser	Lys	Met	Met	Gln	Lys	
			165					170					175				
25	tgt	ata	atg	aat	ggg	gtt	aaa	ttc	cac	caa	gcc	aaa	gtt	ata	aag	gtg	693
	Cys	Ile	Met	Asn	Gly	Val	Lys	Phe	His	Gln	Ala	Lys	Val	Ile	Lys	Val	
		180					185					190					
30	att	cat	gag	gaa	tcg	aaa	tcc	atg	ttg	ata	tgc	aat	gat	ggg	att	act	741
	Ile	His	Glu	Glu	Ser	Lys	Ser	Met	Leu	Ile	Cys	Asn	Asp	Gly	Ile	Thr	
						200					205					210	
35	att	cag	gca	acg	gtg	gtg	ctc	gat	gca	act	ggc	ttc	tct	aga	tct	ctt	789
	Ile	Gln	Ala	Thr	Val	Val	Leu	Asp	Ala	Thr	Gly	Phe	Ser	Arg	Ser	Leu	
					215					220					225		
40	gtt	cag	tat	gat	aag	cct	tat	aac	ccc	ggg	tat	caa	gtt	gct	tat	ggc	837
	Val	Gln	Tyr	Asp	Lys	Pro	Tyr	Asn	Pro	Gly	Tyr	Gln	Val	Ala	Tyr	Gly	
				230					235					240			
45	att	ttg	gct	gaa	gtg	gaa	gag	cac	ccc	ttt	gat	gta	aac	aag	atg	gtt	885
	Ile	Leu	Ala	Glu	Val	Glu	Glu	His	Pro	Phe	Asp	Val	Asn	Lys	Met	Val	
			245					250					255				
50	ttc	atg	gat	tgg	cga	gat	tct	cat	ttg	aag	aac	aat	act	gat	ctc	aag	933
	Phe	Met	Asp	Trp	Arg	Asp	Ser	His	Leu	Lys	Asn	Asn	Thr	Asp	Leu	Lys	
		260					265					270					
55	gag	aga	aat	agt	aga	ata	cca	act	ttt	ctt	tat	gca	atg	cca	ttt	tca	981
	Glu	Arg	Asn	Ser	Arg	Ile	Pro	Thr	Phe	Leu	Tyr	Ala	Met	Pro	Phe	Ser	
		275				280					285					290	
60	tcc	aac	agg	ata	ttt	ctt	gaa	gaa	aca	tca	ctc	gta	gct	cgt	cct	ggc	1029
	Ser	Asn	Arg	Ile	Phe	Leu	Glu	Glu	Thr	Ser	Leu	Val	Ala	Arg	Pro	Gly	
					295					300					305		
65	ttg	cgt	ata	gat	gat	att	caa	gaa	cga	atg	gtg	gct	cgt	tta	aac	cat	1077
	Leu	Arg	Ile	Asp	Asp	Ile	Gln	Glu	Arg	Met	Val	Ala	Arg	Leu	Asn	His	
				310					315					320			
70	ttg	ggg	ata	aaa	gtg	aag	agc	att	gaa	gaa	gat	gaa	cat	tgt	cta	ata	1125
	Leu	Gly	Ile	Lys	Val	Lys	Ser	Ile	Glu	Glu	Asp	Glu	His	Cys	Leu	Ile	
			325					330					335				
75	cca	atg	ggg	ggg	cca	ctt	cca	gta	tta	cct	cag	aga	gtc	gtt	gga	atc	1173
	Pro	Met	Gly	Gly	Pro	Leu	Pro	Val	Leu	Pro	Gln	Arg	Val	Val	Gly	Ile	
			340				345					350					
80	ggg	ggg	aca	gct	ggc	atg	gtt	cat	cca	tcc	acc	ggg	tat	atg	gtg	gca	1221
	Gly	Gly	Thr	Ala	Gly	Met	Val	His	Pro	Ser	Thr	Gly	Tyr	Met	Val	Ala	
			355			360					365					370	
85	agg	aca	cta	gct	gcg	gct	cct	gtt	gtt	gcc	aat	gcc	ata	att	caa	tac	1269
	Arg	Thr	Leu	Ala	Ala	Pro	Val	Val	Ala	Asn	Ala	Ile	Ile	Gln	Tyr		
					375				380						385		

ctc ggt tct gaa aga agt cat tcg ggt aat gaa tta tcc aca gct gtt 1317  
 Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr Ala Val  
 390 395 400

5 tgg aaa gat ttg tgg cct ata gag agg aga cgt caa aga gag ttc ttc 1365  
 Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu Phe Phe  
 405 410 415

10 tgc ttc ggt atg gat att ctt ctg aag ctt gat tta cct gct aca aga 1413  
 Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala Thr Arg  
 420 425 430

15 agg ttc ttt gat gca ttc ttt gac tta gaa cct cgt tat tgg cat ggc 1461  
 Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp His Gly  
 435 440 445 450

20 ttc tta tcg tct cga ttg ttt cta cct gaa ctc ata gtt ttt ggg ctg 1509  
 Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe Gly Leu  
 455 460 465

25 tct cta ttc tct cat gct tca aat act tct aga ttt gag ata atg aca 1557  
 Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile Met Thr  
 470 475 480

30 aag gga act gtt cca tta gta aat atg atc aac aat ttg tta cag gat 1605  
 Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu Gln Asp  
 485 490 495

35 aaa gaa tga atccgagtaa ttcggaatct tgtccaatct cgtgcc 1650  
 Lys Glu  
 500

35 <210> 18  
 <211> 500  
 <212> PRT

40 <213> Lycopersicon esculentum

45 <400> 18  
 Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro  
 1 5 10 15

50 His His Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His  
 20 25 30

55 His Asn Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val  
 35 40 45

60 Cys Val Lys Gly Ser Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr  
 50 55 60

65 Lys Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys  
 65 70 75 80

Gly Val Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu  
 85 90 95

70

## 24

Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile  
100 105 110

5 Asp Pro Asn Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val  
115 120 125

10 Asp Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Ala Thr Trp  
130 135 140

15 Ser Gly Ala Ala Val Tyr Ile Asp Asp Asn Thr Ala Lys Asp Leu His  
145 150 155 160

Arg Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Met  
165 170 175

20 Gln Lys Cys Ile Met Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile  
180 185 190

25 Lys Val Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Met Leu Ile Cys Asn Asp Gly  
195 200 205

30 Ile Thr Ile Gln Ala Thr Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg  
210 215 220

35 Ser Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala  
225 230 235 240

Tyr Gly Ile Leu Ala Glu Val Glu Glu His Pro Phe Asp Val Asn Lys  
245 250 255

40 Met Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Lys Asn Asn Thr Asp  
260 265 270

45 Leu Lys Glu Arg Asn Ser Arg Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro  
275 280 285

50 Phe Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg  
290 295 300

55 Pro Gly Leu Arg Ile Asp Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu  
305 310 315 320

Asn His Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys  
325 330 335

60 Leu Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val  
340 345 350

65 Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met  
355 360 365

70 Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile  
370 375 380

5 Gln Tyr Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr  
 385 390 395 400  
 Ala Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu  
 405 410 415  
 10 Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala  
 420 425 430  
 15 Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp  
 435 440 445  
 20 His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe  
 450 455 460  
 25 Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile  
 465 470 475 480  
 Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu  
 485 490 495  
 30 Gln Asp Lys Glu  
 500  
 35 <210> 19  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 40 <213> Künstliche Sequenz  
 45 <220>  
 <221> primer\_bind  
 50 <222> (1)..(33)  
 <223>  
 55 <400> 19  
 gcatgctcta gaccttataa agatattttg tga 33  
 60 <210> 20  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 65 <213> Künstliche Sequenz  
 70 <220>

```

<221> primer_bind
<222> (1)..(33)
5  <223>

10  <400> 20
    gcatgcatct agaaatgggt cagtgtcaac cat 33

    <210> 21

15  <211> 805
    <212> DNA
    <213> Nostoc sp. Strain PCC7120

20  <220>

25  <221> variation
    <222> (1)..(805)
    <223>

30

    <400> 21
35  gcatgcatct agaaatgggt cagtgtcaac catcatctct gcattcagaa aaactgggtgt 60
    tattgtcatc gacaatcaga gatgataaaa atattaataa gggatatatt attgcctgct 120
    ttatcttatt tttatgggca attagtttaa tcttattact ctcaatagat acatccataa 180
40  ttcataagag cttattaggt atagccatgc tttggcagac cttcttatat acagggttat 240
    ttattactgc tcatgatgcc atgcacggcg tagtttatcc caaaaatccc agaataaata 300
    attttatagg taagctcact ctaatcttgt atggactact cccttataaa gatttattga 360
45  aaaaacattg gttacaccac ggacatcctg gtactgattt agaccctgat tattacaatg 420
    gtcaccccca aaacttcttt ctttgggtatc tacattttat gaagtcttat tggcgatgga 480
50  cgcaaatttt cggattagtg atgatttttc atggacttaa aaatctgggt catataccag 540
    aaaataattt aattatattt tggatgatac cttctatttt aagttcagta caactatttt 600
    attttgggtac atttttgcct cataaaaagc tagaagggtgg ttataactaac cccattgtg 660
55  cgcgcagtat cccattacct cttttttgggt cttttgttac ttgttatcac ttcggtacc 720
    acaaggaaca tcacgaatac cctcaacttc cttggtggaa attacctgaa gctcacaaaa 780
60  tatctttata aggtctagag catgc 805

    <210> 22

65  <211> 24
    <212> DNA
    <213> Künstliche Sequenz

70

```



<220>  
5 <221> primer\_bind  
<222> (1)..(24)  
<223>  
10  
  
<400> 22 24  
aggtaccgca cggctctgcca atcc  
15  
  
<210> 23  
<211> 26  
20 <212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
25  
  
<220>  
<221> primer\_bind  
30 <222> (1)..(26)  
<223>  
  
35  
  
<400> 23 26  
aagcttgacc tgattatcag cacggt  
40  
  
<210> 24  
<211> 4624  
45 <212> DNA  
<213> Erwinia uredovora  
50  
  
<220>  
<221> CDS  
55 <222> (128)..(1267)  
<223>  
  
60  
  
<220>  
<221> CDS  
65 <222> (1288)..(2766)  
<223>  
  
70

<220>  
 <221> CDS  
 5 <222> (2802)..(3689)  
 <223>

10 <220>  
 <221> iDNA  
 15 <222> (3631)..(4158)  
 <223>

20 <400> 24  
 gtcgactttc agcagcgcacat ggcgaaaatc cagacagccc ttcgtttggc aggggggcacc 60  
 atggccgctg ccgatatcat tgagcagggtt atgtgcaccg gtcagcctgt cttaagtggg 120  
 agcgggct atg caa ccg cat tat gat ctg att ctc gtg ggg gct gga ctc 169  
 Met Gln Pro His Tyr Asp Leu Ile Leu Val Gly Ala Gly Leu  
 1 5 10  
 30 gcg aat ggc ctt atc gcc ctg cgt ctt cag cag cag caa cct gat atg 217  
 Ala Asn Gly Leu Ile Ala Leu Arg Leu Gln Gln Gln Gln Pro Asp Met  
 15 20 25 30  
 35 cgt att ttg ctt atc gac gcc gca ccc cag gcg ggc ggg aat cat acg 265  
 Arg Ile Leu Leu Ile Asp Ala Ala Pro Gln Ala Gly Gly Asn His Thr  
 35 40 45  
 40 tgg tca ttt cac cac gat gat ttg act gag agc caa cat cgt tgg ata 313  
 Trp Ser Phe His His Asp Asp Leu Thr Glu Ser Gln His Arg Trp Ile  
 50 55 60  
 gct ccg ctg gtg gtt cat cac tgg ccc gac tat cag gta cgc ttt ccc 361  
 Ala Pro Leu Val Val His His Trp Pro Asp Tyr Gln Val Arg Phe Pro  
 65 70 75  
 45 aca cgc cgt cgt aag ctg aac agc ggc tac ttt tgt att act tct cag 409  
 Thr Arg Arg Arg Lys Leu Asn Ser Gly Tyr Phe Cys Ile Thr Ser Gln  
 80 85 90  
 50 cgt ttc gct gag gtt tta cag cga cag ttt ggc ccg cac ttg tgg atg 457  
 Arg Phe Ala Glu Val Leu Gln Arg Gln Phe Gly Pro His Leu Trp Met  
 95 100 105 110  
 55 gat acc gcg gtc gca gag gtt aat gcg gaa tct gtt cgg ttg aaa aag 505  
 Asp Thr Ala Val Ala Glu Val Asn Ala Glu Ser Val Arg Leu Lys Lys  
 115 120 125  
 60 ggt cag gtt atc ggt gcc cgc gcg gtg att gac ggg cgg ggt tat gcg 553  
 Gly Gln Val Ile Gly Ala Arg Ala Val Ile Asp Gly Arg Gly Tyr Ala  
 130 135 140  
 65 gca aat tca gca ctg agc gtg ggc ttc cag gcg ttt att ggc cag gaa 601  
 Ala Asn Ser Ala Leu Ser Val Gly Phe Gln Ala Phe Ile Gly Gln Glu  
 145 150 155  
 70 tgg cga ttg agc cac ccg cat ggt tta tcg tct ccc att atc atg gat 649  
 Trp Arg Leu Ser His Pro His Gly Leu Ser Ser Pro Ile Ile Met Asp  
 160 165 170  
 gcc acg gtc gat cag caa aat ggt tat cgc ttc gtg tac agc ctg ccg 697

## 29

	Ala Thr Val Asp Gln Gln Asn Gly Tyr Arg Phe Val Tyr Ser Leu Pro	175	180	185	190	
5	ctc tcg ccg acc aga ttg tta att gaa gac acg cac tat att gat aat Leu Ser Pro Thr Arg Leu Leu Ile Glu Asp Thr His Tyr Ile Asp Asn	195	200	205	745	
10	gcg aca tta gat cct gaa tgc gcg cgg caa aat att tgc gac tat gcc Ala Thr Leu Asp Pro Glu Cys Ala Gln Asn Ile Cys Asp Tyr Ala	210	215	220	793	
15	gcg caa cag ggt tgg cag ctt cag aca ctg ctg cga gaa gaa cag gcc Ala Gln Gln Gly Trp Gln Leu Gln Thr Leu Leu Arg Glu Glu Gln Gly	225	230	235	841	
20	gcc tta ccc att act ctg tcg gcc aat gcc gac gca ttc tgg cag cag Ala Leu Pro Ile Thr Leu Ser Gly Asn Ala Asp Ala Phe Trp Gln Gln	240	245	250	889	
25	cgc ccc ctg gcc tgt agt gga tta cgt gcc ggt ctg ttc cat cct acc Arg Pro Leu Ala Cys Ser Gly Leu Arg Ala Gly Leu Phe His Pro Thr	255	260	265	937	
30	acc ggc tat tca ctg ccg ctg gcg gtt gcc gtg gcc gac cgc ctg agt Thr Gly Tyr Ser Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Asp Arg Leu Ser	275	280	285	985	
35	gca ctt gat gtc ttt acg tcg gcc tca att cac cat gcc att acg cat Ala Leu Asp Val Phe Thr Ser Ala Ser Ile His His Ala Ile Thr His	290	295	300	1033	
40	ttt gcc cgc gag cgc tgg cag cag cag gcc ttt ttc cgc atg ctg aat Phe Ala Arg Glu Arg Trp Gln Gln Gly Phe Phe Arg Met Leu Asn	305	310	315	1081	
45	cgc atg ctg ttt tta gcc gga ccc gcc gat tca cgc tgg cgg gtt atg Arg Met Leu Phe Leu Ala Gly Pro Ala Asp Ser Arg Trp Arg Val Met	320	325	330	1129	
50	cag cgt ttt tat ggt tta cct gaa gat tta att gcc cgt ttt tat gcg Gln Arg Phe Tyr Gly Leu Pro Glu Asp Leu Ile Ala Arg Phe Tyr Ala	335	340	345	1177	
55	gga aaa ctc acg ctg acc gat cgg cta cgt att ctg agc ggc aag ccg Gly Lys Leu Thr Leu Thr Asp Arg Leu Arg Ile Leu Ser Gly Lys Pro	355	360	365	1225	
60	cct gtt ccg gta tta gca gca ttg caa gcc att atg acg act Pro Val Pro Val Leu Ala Ala Leu Gln Ala Ile Met Thr Thr	370	375	380	1267	
65	catcggttaaa gagcgactac atg aaa cca act acg gta att ggt gca ggc ttc Met Lys Pro Thr Thr Val Ile Gly Ala Gly Phe	385	390		1320	
70	ggt ggc ctg gca ctg gca att cgt cta caa gct gcg ggg atc ccc gtc Gly Gly Leu Ala Leu Ala Ile Arg Leu Gln Ala Ala Gly Ile Pro Val	395	400	405	1368	
75	tta ctg ctt gaa caa cgt gat aaa ccc gcc ggt cgg gct tat gtc tac Leu Leu Leu Glu Gln Arg Asp Lys Pro Gly Gly Arg Ala Tyr Val Tyr	410	415	420	1416	
80	gag gat cag ggg ttt acc ttt gat gca ggc ccg acg gtt atc acc gat Glu Asp Gln Gly Phe Thr Phe Asp Ala Gly Pro Thr Val Ile Thr Asp	425	430	435	1464	
85	ccc agt gcc att gaa gaa ctg ttt gca ctg gca gga aaa cag tta aaa Pro Ser Ala Ile Glu Leu Phe Ala Leu Ala Gly Lys Gln Leu Lys	440	445	450	1512	

	gag tat gtc gaa ctg ctg ccg gtt acg ccg ttt tac cgc ctg tgt tgg	1560
	Glu Tyr Val Glu Leu Leu Pro Val Thr Pro Phe Tyr Arg Leu Cys Trp	
	460 465 470	
5	gag tca ggg aag gtc ttt aat tac gat aac gat caa acc cgg ctc gaa	1608
	Glu Ser Gly Lys Val Phe Asn Tyr Asp Asn Asp Gln Thr Arg Leu Glu	
	475 480 485	
10	gcg cag att cag cag ttt aat ccc cgc gat gtc gaa ggt tat cgt cag	1656
	Ala Gln Ile Gln Gln Phe Asn Pro Arg Asp Val Glu Gly Tyr Arg Gln	
	490 495 500	
15	ttt ctg gac tat tca cgc gcg gtg ttt aaa gaa ggc tat cta aag ctc	1704
	Phe Leu Asp Tyr Ser Arg Ala Val Phe Lys Glu Gly Tyr Leu Lys Leu	
	505 510 515	
20	ggt act gtc cct ttt tta tgc ttc aga gac atg ctt cgc gcc gca cct	1752
	Gly Thr Val Pro Phe Leu Ser Phe Arg Asp Met Leu Arg Ala Ala Pro	
	520 525 530 535	
25	caa ctg gcg aaa ctg cag gca tgg aga agc gtt tac agt aag gtt gcc	1800
	Gln Leu Ala Lys Leu Gln Ala Trp Arg Ser Val Tyr Ser Lys Val Ala	
	540 545 550	
30	agt tac atc gaa gat gaa cat ctg cgc cag gcg ttt tct ttc cac tgc	1848
	Ser Tyr Ile Glu Asp Glu His Leu Arg Gln Ala Phe Ser Phe His Ser	
	555 560 565	
35	ctg ttg gtg ggc ggc aat ccc ttc gcc acc tca tcc att tat acg ttg	1896
	Leu Leu Val Gly Gly Asn Pro Phe Ala Thr Ser Ser Ile Tyr Thr Leu	
	570 575 580	
40	ata cac gcg ctg gag cgt gag tgg ggc gtc tgg ttt ccg cgt ggc ggc	1944
	Ile His Ala Leu Glu Arg Glu Trp Gly Val Trp Phe Pro Arg Gly Gly	
	585 590 595	
45	acc ggc gca tta gtt cag ggg atg ata aag ctg ttt cag gat ctg ggt	1992
	Thr Gly Ala Leu Val Gln Gly Met Ile Lys Leu Phe Gln Asp Leu Gly	
	600 605 610 615	
50	ggc gaa gtc gtg tta aac gcc aga gtc agc cat atg gaa acg aca gga	2040
	Gly Glu Val Val Leu Asn Ala Arg Val Ser His Met Glu Thr Thr Gly	
	620 625 630	
55	aac aag att gaa gcc gtg cat tta gag gac ggt cgc agg ttc ctg acg	2088
	Asn Lys Ile Glu Ala Val His Leu Glu Asp Gly Arg Arg Phe Leu Thr	
	635 640 645	
60	caa gcc gtc gcg tca aat gca gat gtg gtt cat acc tat cgc gac ctg	2136
	Gln Ala Val Ala Ser Asn Ala Asp Val Val His Thr Tyr Arg Asp Leu	
	650 655 660	
65	tta agc cag cac cct gcc gcg gtt aag cag tcc aac aaa ctg cag act	2184
	Leu Ser Gln His Pro Ala Ala Val Lys Gln Ser Asn Lys Leu Gln Thr	
	665 670 675	
70	aag cgc atg agt aac tct ctg ttt gtg ctc tat ttt ggt ttg aat cac	2232
	Lys Arg Met Ser Asn Ser Leu Phe Val Leu Tyr Phe Gly Leu Asn His	
	680 685 690 695	
75	cat cat gat cag ctc gcg cat cac acg gtt tgt ttc ggc ccg cgt tac	2280
	His His Asp Gln Leu Ala His His Thr Val Cys Phe Gly Pro Arg Tyr	
	700 705 710	
80	cgc gag ctg att gac gaa att ttt aat cat gat ggc ctc gca gag gac	2328
	Arg Glu Leu Ile Asp Glu Ile Phe Asn His Asp Gly Leu Ala Glu Asp	
	715 720 725	
85	ttc tca ctt tat ctg cac gcg ccc tgt gtc acg gat tgc tca ctg gcg	2376

	Phe	Ser	Leu	Tyr	Leu	His	Ala	Pro	Cys	Val	Thr	Asp	Ser	Ser	Leu	Ala	
			730					735					740				
5	cct	gaa	ggt	tgc	ggc	agt	tac	tat	gtg	ttg	gcg	ccg	gtg	ccg	cat	tta	2424
	Pro	Glu	Gly	Cys	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Val	Leu	Ala	Pro	Val	Pro	His	Leu	
			745				750					755					
10	ggc	acc	gcg	aac	ctc	gac	tgg	acg	gtt	gag	ggg	cca	aaa	cta	cgc	gac	2472
	Gly	Thr	Ala	Asn	Leu	Asp	Trp	Thr	Val	Glu	Gly	Pro	Lys	Leu	Arg	Asp	
			760			765					770					775	
15	cgt	att	ttt	gcg	tac	ctt	gag	cag	cat	tac	atg	cct	ggc	tta	cgg	agt	2520
	Arg	Ile	Phe	Ala	Tyr	Leu	Glu	Gln	His	Tyr	Met	Pro	Gly	Leu	Arg	Ser	
					780					785					790		
20	cag	ctg	gtc	acg	cac	cgg	atg	ttt	acg	ccg	ttt	gat	ttt	cgc	gac	cag	2568
	Gln	Leu	Val	Thr	His	Arg	Met	Phe	Thr	Pro	Phe	Asp	Phe	Arg	Asp	Gln	
					795				800					805			
25	ctt	aat	gcc	tat	cat	ggc	tca	gcc	ttt	tct	gtg	gag	ccc	gtt	ctt	acc	2616
	Leu	Asn	Ala	Tyr	His	Gly	Ser	Ala	Phe	Ser	Val	Glu	Pro	Val	Leu	Thr	
								815					820				
30	cag	agc	gcc	tgg	ttt	cgg	ccg	cat	aac	cgc	gat	aaa	acc	att	act	aat	2664
	Gln	Ser	Ala	Trp	Phe	Arg	Pro	His	Asn	Arg	Asp	Lys	Thr	Ile	Thr	Asn	
							830					835					
35	ctc	tac	ctg	gtc	ggc	gca	ggc	acg	cat	ccc	ggc	gca	ggc	att	cct	ggc	2712
	Leu	Tyr	Leu	Val	Gly	Ala	Gly	Thr	His	Pro	Gly	Ala	Gly	Ile	Pro	Gly	
						845					850					855	
40	gtc	atc	ggc	tgc	gca	aaa	gcg	aca	gca	ggt	ttg	atg	ctg	gag	gat	ctg	2760
	Val	Ile	Gly	Ser	Ala	Lys	Ala	Thr	Ala	Gly	Leu	Met	Leu	Glu	Asp	Leu	
						860				865					870		
45	att	tga	ataatccg	gtc	gttactcaat	catgcggtcg	aaacg	atg	gca	gtt	ggc						2813
	Ile								Met	Ala	Val	Gly				875	
50	tcg	aaa	agt	ttt	gcg	aca	gcc	tca	aag	tta	ttt	gat	gca	aaa	acc	cgg	2861
	Ser	Lys	Ser	Phe	Ala	Thr	Ala	Ser	Lys	Leu	Phe	Asp	Ala	Lys	Thr	Arg	
						880			885					890			
55	cgc	agc	gta	ctg	atg	ctc	tac	gcc	tgg	tgc	cgc	cat	tgt	gac	gat	gtt	2909
	Arg	Ser	Val	Leu	Met	Leu	Tyr	Ala	Trp	Cys	Arg	His	Cys	Asp	Asp	Val	
								900					905				
60	att	gac	gat	cag	acg	ctg	ggc	ttt	cag	gcc	cgg	cag	cct	gcc	tta	caa	2957
	Ile	Asp	Asp	Gln	Thr	Leu	Gly	Phe	Gln	Ala	Arg	Gln	Pro	Ala	Leu	Gln	
							915					920					
65	acg	ccc	gaa	caa	cgt	ctg	atg	caa	ctt	gag	atg	aaa	acg	cgc	cag	gcc	3005
	Thr	Pro	Glu	Gln	Arg	Leu	Met	Gln	Leu	Glu	Met	Lys	Thr	Arg	Gln	Ala	
							930				935					940	
70	tat	gca	gga	tgc	cag	atg	cac	gaa	ccg	gcg	ttt	gcg	gct	ttt	cag	gaa	3053
	Tyr	Ala	Gly	Ser	Gln	Met	His	Glu	Pro	Ala	Phe	Ala	Ala	Phe	Gln	Glu	
						945				950					955		
75	gtg	gct	atg	gct	cat	gat	atc	gcc	ccg	gct	tac	gcg	ttt	gat	cat	ctg	3101
	Val	Ala	Met	Ala	His	Asp	Ile	Ala	Pro	Ala	Tyr	Ala	Phe	Asp	His	Leu	
						960			965					970			
80	gaa	ggc	ttc	gcc	atg	gat	gta	cgc	gaa	gcg	caa	tac	agc	caa	ctg	gat	3149
	Glu	Gly	Phe	Ala	Met	Asp	Val	Arg	Glu	Ala	Gln	Tyr	Ser	Gln	Leu	Asp	
						975			980				985				
85	gat	acg	ctg	cgc	tat	tgc	tat	cac	gtt	gca	ggc	gtt	gtc	ggc	ttg	atg	3197
	Asp	Thr	Leu	Arg	Tyr	Cys	Tyr	His	Val	Ala	Gly	Val	Val	Gly	Leu	Met	
							995					1000					

5	atg gcg caa atc atg ggc gtg cgg gat aac gcc acg ctg gac cgc 3242 Met Ala Gln Ile Met Gly Val Arg Asp Asn Ala Thr Leu Asp Arg 1005 1010 1015
	gcc tgt gac ctt ggg ctg gca ttt cag ttg acc aat att gct cgc 3287 Ala Cys Asp Leu Gly Leu Ala Phe Gln Leu Thr Asn Ile Ala Arg 1020 1025 1030
	gat att gtg gac gat gcg cat gcg ggc cgc tgt tat ctg ccg gca 3332 Asp Ile Val Asp Asp Ala His Ala Gly Arg Cys Tyr Leu Pro Ala 1035 1040 1045
	agc tgg ctg gag cat gaa ggt ctg aac aaa gag aat tat gcg gca 3377 Ser Trp Leu Glu His Glu Gly Leu Asn Lys Glu Asn Tyr Ala Ala 1050 1055 1060
	cct gaa aac cgt cag gcg ctg agc cgt atc gcc cgt cgt ttg gtg 3422 Pro Glu Asn Arg Gln Ala Leu Ser Arg Ile Ala Arg Arg Leu Val 1065 1070 1075
5	cag gaa gca gaa cct tac tat ttg tct gcc aca gcc ggc ctg gca 3467 Gln Glu Ala Glu Pro Tyr Tyr Leu Ser Ala Thr Ala Gly Leu Ala 1080 1085 1090
	ggg ttg ccc ctg cgt tcc gcc tgg gca atc gct acg gcg aag cag 3512 Gly Leu Pro Leu Arg Ser Ala Trp Ala Ile Ala Thr Ala Lys Gln 1095 1100 1105
	gtt tac cgg aaa ata ggt gtc aaa gtt gaa cag gcc ggt cag caa 3557 Val Tyr Arg Lys Ile Gly Val Lys Val Glu Gln Ala Gly Gln Gln 1110 1115 1120
	gcc tgg gat cag cgg cag tca acg acc acg ccc gaa aaa tta acg 3602 Ala Trp Asp Gln Arg Gln Ser Thr Thr Thr Pro Glu Lys Leu Thr 1125 1130 1135
	ctg ctg ctg gcc gcc tct ggt cag gcc ctt act tcc cgg atg cgg 3647 Leu Leu Leu Ala Ala Ser Gly Gln Ala Leu Thr Ser Arg Met Arg 1140 1145 1150
45	gct cat cct ccc cgc cct gcg cat ctc tgg cag cgc ccg ctc 3689 Ala His Pro Pro Arg Pro Ala His Leu Trp Gln Arg Pro Leu 1155 1160 1165
	tagcgccatg tctttcccg agcgtcgct gaagttttga caggggcggc gcatagagga 3749
	agccaaaaga aacacaacct tctttgcccc tgacggcgtg atgcatacgg tgcgccatat 3809
	acaaccgttt gaggtagccc ttgctgtgaa tatagcggaa tggccaacgt tgatgcacca 3869
	gcccgtcgtg caccataaaa tagagtaatc catacgccgt catacctgcg ccaatccact 3929
55	ggagcggcca cattcctgta ctgcccagat aaatcagcag gatcgataat gcagcaaaaa 3989
	ccacggcata aagatcgta acttcaaacg cacctttacg cggttcatga tgtgaaagat 4049
	gccatcccca accccagccg tgcgatgatgt atttgtgtgc cagtgcagca atcacttcca 4109
	tgccaatcac ggtaacgaaa acgatcaggg cattccaaat ccacaacata atttctccgg 4169
	tagagacgtc tggcagcagg cttaaggait caattttaac agagattagc cgatctggcg 4229
65	gcgggaaggg aaaaaggcgc gccagaaagg cgcgccaggg atcagaagtc ggctttcaga 4289
	accacacggg agttggcttt acctgcacga acatgggtcca gtgcatcggt gattttcgac 4349
	atcggaagt actccactgt cggcgcaata tctgtacggc cagccagctt cagcagtgaa 4409
	cgagctgcg caggtgaacc ggttgaagaa cccgtcacgg cgcggtcgcc taaaatcagg 4469

ctgaaagccg ggcacgtcaa acggcttcag tacggcaccc acggtatgga acttaccgcg 4529  
 aggcgccagg gccgcaaagt aggggttgcca gtcgagatcg acggcgaccg tgctgataat 4589  
 5 cagggtcaaac tggcccgcca ggcttttttaa agctt 4624  
  
 <210> 25  
 10 <211> 380  
 <212> PRT  
 15 <213> Erwinia uredovora  
  
 <400> 25  
 20 Met Gln Pro His Tyr Asp Leu Ile Leu Val Gly Ala Gly Leu Ala Asn  
 1 5 10 15  
 5 Gly Leu Ile Ala Leu Arg Leu Gln Gln Gln Gln Pro Asp Met Arg Ile  
 20 25 30  
 30 Leu Leu Ile Asp Ala Ala Pro Gln Ala Gly Gly Asn His Thr Trp Ser  
 35 35 40 45  
 Phe His His Asp Asp Leu Thr Glu Ser Gln His Arg Trp Ile Ala Pro  
 50 55 60  
 35 Leu Val Val His His Trp Pro Asp Tyr Gln Val Arg Phe Pro Thr Arg  
 65 70 75 80  
 40 Arg Arg Lys Leu Asn Ser Gly Tyr Phe Cys Ile Thr Ser Gln Arg Phe  
 85 90 95  
 45 Ala Glu Val Leu Gln Arg Gln Phe Gly Pro His Leu Trp Met Asp Thr  
 100 105 110  
 50 Ala Val Ala Glu Val Asn Ala Glu Ser Val Arg Leu Lys Lys Gly Gln  
 115 120 125  
 55 Val Ile Gly Ala Arg Ala Val Ile Asp Gly Arg Gly Tyr Ala Ala Asn  
 130 135 140  
 Ser Ala Leu Ser Val Gly Phe Gln Ala Phe Ile Gly Gln Glu Trp Arg  
 145 150 155 160  
 60 Leu Ser His Pro His Gly Leu Ser Ser Pro Ile Ile Met Asp Ala Thr  
 165 170 175  
 65 Val Asp Gln Gln Asn Gly Tyr Arg Phe Val Tyr Ser Leu Pro Leu Ser  
 180 185 190  
 70 Pro Thr Arg Leu Leu Ile Glu Asp Thr His Tyr Ile Asp Asn Ala Thr  
 195 200 205

5 Leu Asp Pro Glu Cys Ala Arg Gln Asn Ile Cys Asp Tyr Ala Ala Gln  
 210 215 220  
 Gln Gly Trp Gln Leu Gln Thr Leu Leu Arg Glu Glu Gln Gly Ala Leu  
 225 230 235 240  
 10 Pro Ile Thr Leu Ser Gly Asn Ala Asp Ala Phe Trp Gln Gln Arg Pro  
 245 250 255  
 15 Leu Ala Cys Ser Gly Leu Arg Ala Gly Leu Phe His Pro Thr Thr Gly  
 260 265 270  
 20 Tyr Ser Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Asp Arg Leu Ser Ala Leu  
 275 280 285  
 25 Asp Val Phe Thr Ser Ala Ser Ile His His Ala Ile Thr His Phe Ala  
 290 295 300  
 30 Arg Glu Arg Trp Gln Gln Gln Gly Phe Phe Arg Met Leu Asn Arg Met  
 305 310 315 320  
 35 Leu Phe Leu Ala Gly Pro Ala Asp Ser Arg Trp Arg Val Met Gln Arg  
 325 330 335  
 40 Phe Tyr Gly Leu Pro Glu Asp Leu Ile Ala Arg Phe Tyr Ala Gly Lys  
 340 345 350  
 45 Leu Thr Leu Thr Asp Arg Leu Arg Ile Leu Ser Gly Lys Pro Pro Val  
 355 360 365  
 50 Pro Val Leu Ala Ala Leu Gln Ala Ile Met Thr Thr  
 370 375 380  
 <210> 26  
 <211> 492  
 <212> PRT  
 <213> Erwinia uredovora  
 55 <400> 26  
 60 Met Lys Pro Thr Thr Val Ile Gly Ala Gly Phe Gly Gly Leu Ala Leu  
 1 5 10 15  
 65 Ala Ile Arg Leu Gln Ala Ala Gly Ile Pro Val Leu Leu Leu Glu Gln  
 20 25 30  
 70 Arg Asp Lys Pro Gly Gly Arg Ala Tyr Val Tyr Glu Asp Gln Gly Phe  
 35 40 45



## 35

Thr Phe Asp Ala Gly Pro Thr Val Ile Thr Asp Pro Ser Ala Ile Glu  
 50 55 60  
 5  
 Glu Leu Phe Ala Leu Ala Gly Lys Gln Leu Lys Glu Tyr Val Glu Leu  
 65 70 75 80  
 10  
 Leu Pro Val Thr Pro Phe Tyr Arg Leu Cys Trp Glu Ser Gly Lys Val  
 85 90 95  
 15  
 Phe Asn Tyr Asp Asn Asp Gln Thr Arg Leu Glu Ala Gln Ile Gln Gln  
 100 105 110  
 20  
 Phe Asn Pro Arg Asp Val Glu Gly Tyr Arg Gln Phe Leu Asp Tyr Ser  
 115 120 125  
 Arg Ala Val Phe Lys Glu Gly Tyr Leu Lys Leu Gly Thr Val Pro Phe  
 130 135 140  
 25  
 Leu Ser Phe Arg Asp Met Leu Arg Ala Ala Pro Gln Leu Ala Lys Leu  
 145 150 155 160  
 30  
 Gln Ala Trp Arg Ser Val Tyr Ser Lys Val Ala Ser Tyr Ile Glu Asp  
 165 170 175  
 35  
 Glu His Leu Arg Gln Ala Phe Ser Phe His Ser Leu Leu Val Gly Gly  
 180 185 190  
 40  
 Asn Pro Phe Ala Thr Ser Ser Ile Tyr Thr Leu Ile His Ala Leu Glu  
 195 200 205  
 Arg Glu Trp Gly Val Trp Phe Pro Arg Gly Gly Thr Gly Ala Leu Val  
 210 215 220  
 45  
 Gln Gly Met Ile Lys Leu Phe Gln Asp Leu Gly Gly Glu Val Val Leu  
 225 230 235 240  
 50  
 Asn Ala Arg Val Ser His Met Glu Thr Thr Gly Asn Lys Ile Glu Ala  
 245 250 255  
 55  
 Val His Leu Glu Asp Gly Arg Arg Phe Leu Thr Gln Ala Val Ala Ser  
 260 265 270  
 60  
 Asn Ala Asp Val Val His Thr Tyr Arg Asp Leu Leu Ser Gln His Pro  
 275 280 285  
 Ala Ala Val Lys Gln Ser Asn Lys Leu Gln Thr Lys Arg Met Ser Asn  
 290 295 300  
 65  
 Ser Leu Phe Val Leu Tyr Phe Gly Leu Asn His His His Asp Gln Leu  
 305 310 315 320  
 70  
 Ala His His Thr Val Cys Phe Gly Pro Arg Tyr Arg Glu Leu Ile Asp

335

Pro Ala Leu Gln Thr Pro Glu Gln Arg Leu Met Gln Leu Glu Met Lys  
50 55 60

Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Gly Ser Gln Met His Glu Pro Ala Phe Ala  
 65 70 75 80  
 5 Ala Phe Gln Glu Val Ala Met Ala His Asp Ile Ala Pro Ala Tyr Ala  
 85 90 95  
 10 Phe Asp His Leu Glu Gly Phe Ala Met Asp Val Arg Glu Ala Gln Tyr  
 100 105 110  
 15 Ser Gln Leu Asp Asp Thr Leu Arg Tyr Cys Tyr His Val Ala Gly Val  
 115 120 125  
 20 Val Gly Leu Met Met Ala Gln Ile Met Gly Val Arg Asp Asn Ala Thr  
 130 135 140  
 Leu Asp Arg Ala Cys Asp Leu Gly Leu Ala Phe Gln Leu Thr Asn Ile  
 145 150 155 160  
 25 Ala Arg Asp Ile Val Asp Asp Ala His Ala Gly Arg Cys Tyr Leu Pro  
 165 170 175  
 30 Ala Ser Trp Leu Glu His Glu Gly Leu Asn Lys Glu Asn Tyr Ala Ala  
 180 185 190  
 35 Pro Glu Asn Arg Gln Ala Leu Ser Arg Ile Ala Arg Arg Leu Val Gln  
 195 200 205  
 40 Glu Ala Glu Pro Tyr Tyr Leu Ser Ala Thr Ala Gly Leu Ala Gly Leu  
 210 215 220  
 Pro Leu Arg Ser Ala Trp Ala Ile Ala Thr Ala Lys Gln Val Tyr Arg  
 225 230 235 240  
 45 Lys Ile Gly Val Lys Val Glu Gln Ala Gly Gln Gln Ala Trp Asp Gln  
 245 250 255  
 50 Arg Gln Ser Thr Thr Thr Pro Glu Lys Leu Thr Leu Leu Leu Ala Ala  
 260 265 270  
 55 Ser Gly Gln Ala Leu Thr Ser Arg Met Arg Ala His Pro Pro Arg Pro  
 275 280 285  
 60 Ala His Leu Trp Gln Arg Pro Leu  
 290 295  
 <210> 28  
 <211> 32  
 65 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

```

5  <220>
    <221> primer_bind
    <222> (1)..(32)
    <223>
10
    <400> 28
    tttttctcga gcgataaacg ctcaacttggt ta 32
15
    <210> 29
    <211> 32
    <212> DNA
    <213> Künstliche Sequenz
20
25
    <220>
    <221> primer_bind
    <222> (1)..(32)
    <223>
30
35
    <400> 29
    tttttgtcga cacgttatgc tcacaacccc gg 32
40
    <210> 30
    <211> 679
    <212> DNA
    <213> Escherichia coli
45
50
    <220>
    <221> CDS
55
    <222> (87)..(635)
    <223>
60
    <400> 30
    ctcgagcgat aaacgctcac ttggttaatc atttcactct tcaattatct ataatgatga 60
    gtgatcagaa ttacatgtga gaaatt atg caa acg gaa cac gtc att tta ttg 113
    Met Gln Thr Glu His Val Ile Leu Leu
    1 5
70
    aat gca cag gga gtt ccc acg ggt acg ctg gaa aag tat gcc gca cac 161
    Asn Ala Gln Gly Val Pro Thr Gly Thr Leu Glu Lys Tyr Ala Ala His
    10 15 20 25

```

acg gca gac acc cgc tta cat ctc gcg ttc tcc agt tgg ctg ttt aat 209  
 Thr Ala Asp Thr Arg Leu His Leu Ala Phe Ser Ser Trp Leu Phe Asn  
 30 35 40  
 5 gcc aaa gga caa tta tta gtt acc cgc cgc gca ctg agc aaa aaa gca 257  
 Ala Lys Gly Gln Leu Leu Val Thr Arg Arg Ala Leu Ser Lys Lys Ala  
 45 50 55  
 10 tgg cct ggc gtg tgg act aac tcg gtt tgt ggg cac cca caa ctg gga 305  
 Trp Pro Gly Val Trp Thr Asn Ser Val Cys Gly His Pro Gln Leu Gly  
 60 65 70  
 15 gaa agc aac gaa gac gca gtg atc cgc cgt tgc cgt tat gag ctt ggc 353  
 Glu Ser Asn Glu Asp Ala Val Ile Arg Arg Cys Arg Tyr Glu Leu Gly  
 75 80 85  
 20 gtg gaa att acg cct cct gaa tct atc tat cct gac ttt cgc tac cgc 401  
 Val Glu Ile Thr Pro Pro Glu Ser Ile Tyr Pro Asp Phe Arg Tyr Arg  
 90 95 100 105  
 25 gcc acc gat ccg agt ggc att gtg gaa aat gaa gtg tgt ccg gta ttt 449  
 Ala Thr Asp Pro Ser Gly Ile Val Glu Asn Glu Val Cys Pro Val Phe  
 110 115 120  
 gcc gca cgc acc act agt gcg tta cag atc aat gat gat gaa gtg atg 497  
 Ala Ala Arg Thr Thr Ser Ala Leu Gln Ile Asn Asp Asp Glu Val Met  
 125 130 135  
 30 gat tat caa tgg tgt gat tta gca gat gta tta cac ggt att gat gcc 545  
 Asp Tyr Gln Trp Cys Asp Leu Ala Asp Val Leu His Gly Ile Asp Ala  
 140 145 150  
 35 acg ccg tgg gcg ttc agt ccg tgg atg gtg atg cag gcg aca aat cgc 593  
 Thr Pro Trp Ala Phe Ser Pro Trp Met Val Met Gln Ala Thr Asn Arg  
 155 160 165  
 40 gaa gcc aga aaa cga tta tct gca ttt acc cag ctt aaa taa 635  
 Glu Ala Arg Lys Arg Leu Ser Ala Phe Thr Gln Leu Lys  
 170 175 180  
 aaaaaccccg acatttgccg gggttgtgag cataacgtgt cgac 679  
 45 <210> 31  
 <211> 182  
 50 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli  
 55 <400> 31  
 Met Gln Thr Glu His Val Ile Leu Leu Asn Ala Gln Gly Val Pro Thr  
 1 5 10 15  
 60 Gly Thr Leu Glu Lys Tyr Ala Ala His Thr Ala Asp Thr Arg Leu His  
 20 25 30  
 65 Leu Ala Phe Ser Ser Trp Leu Phe Asn Ala Lys Gly Gln Leu Leu Val  
 35 40 45  
 70 Thr Arg Arg Ala Leu Ser Lys Lys Ala Trp Pro Gly Val Trp Thr Asn

50

55

60

5 Ser Val Cys Gly His Pro Gln Leu Gly Glu Ser Asn Glu Asp Ala Val  
 65 70 75 80  
 10 Ile Arg Arg Cys Arg Tyr Glu Leu Gly Val Glu Ile Thr Pro Pro Glu  
 85 90 95  
 15 Ser Ile Tyr Pro Asp Phe Arg Tyr Arg Ala Thr Asp Pro Ser Gly Ile  
 100 105 110  
 Val Glu Asn Glu Val Cys Pro Val Phe Ala Ala Arg Thr Thr Ser Ala  
 115 120 125  
 20 Leu Gln Ile Asn Asp Asp Glu Val Met Asp Tyr Gln Trp Cys Asp Leu  
 130 135 140  
 25 Ala Asp Val Leu His Gly Ile Asp Ala Thr Pro Trp Ala Phe Ser Pro  
 145 150 155 160  
 30 Trp Met Val Met Gln Ala Thr Asn Arg Glu Ala Arg Lys Arg Leu Ser  
 165 170 175  
 35 Ala Phe Thr Gln Leu Lys  
 180  
 <210> 32  
 <211> 31  
 40 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 45  
 <220>  
 <221> primer\_bind  
 50 <222> (1)..(31)  
 <223>  
 55  
 <400> 32  
 tttttccatg gtgaaggagg aaatagcgaa a  
 60  
 <210> 33  
 <211> 32  
 65 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 70

```

<220>
<221> primer_bind
5 <222> (1)..(32)
<223>

10 <400> 33
    tttttaagct ttcactttttt tcttgtaacc aa 32

15 <210> 34
    <211> .962
    <212> DNA
20 <213> Archaeoglobus fulgidus

25 <220>
    <221> CDS
30 <222> (3)..(956)
    <223>

35 <400> 34
    cc atg gtg aag gag gaa ata gcg aaa agg gcc gaa ata atc aac aaa 47
       Met Val Lys Glu Glu Ile Ala Lys Arg Ala Glu Ile Ile Asn Lys
       1 5 10 15
40 gcc att gaa gag ctt ctg ccc gaa agg gag ccg att gga ctc tac aaa 95
    Ala Ile Glu Glu Leu Leu Pro Glu Arg Glu Pro Ile Gly Leu Tyr Lys
       20 25 30
45 gcc gca agg cat ctg atc aaa gca ggt ggc aag agg cta agg cct gta 143
    Ala Ala Arg His Leu Ile Lys Ala Gly Lys Arg Leu Arg Pro Val
       35 40 45
50 ata agc ctc tta gca gtc gaa gcc ctt ggg aaa gac tac aga aag att 191
    Ile Ser Leu Leu Ala Val Glu Ala Leu Gly Lys Asp Tyr Arg Lys Ile
       50 55 60
55 atc ccg gct gct gtc agc att gaa aca atc cac aac ttc acc ctc gtg 239
    Ile Pro Ala Ala Val Ser Ile Glu Thr Ile His Asn Phe Thr Leu Val
       65 70 75
60 cat gac gac ata atg gac agg gac gag atg agg agg gga gtt ccg acg 287
    His Asp Asp Ile Met Asp Arg Asp Glu Met Arg Arg Gly Val Pro Thr
       80 85 90 95
65 gta cac agg gtt tat ggg gaa gcg acg gcc att tta gca ggc gac aca 335
    Val His Arg Val Tyr Gly Glu Ala Thr Ala Ile Leu Ala Gly Asp Thr
       100 105 110
70 ctc ttt gct gaa gcc ttc aag ctg ctg aca aag tgc gat gtt gag agc 383
    Leu Phe Ala Glu Ala Phe Lys Leu Thr Lys Cys Asp Val Glu Ser
       115 120 125
    gag gga atc aga aaa gct aca gaa atg ctt tcg gac gtt tgc ata aaa 431
    Glu Gly Ile Arg Lys Ala Thr Glu Met Leu Ser Asp Val Cys Ile Lys
       130 135 140

```

5	ata tgc gag ggg cag tac tac gac atg agc ttt gag aaa aag gag agc Ile Cys Glu Gly Gln Tyr Tyr Asp Met Ser Phe Glu Lys Lys Glu Ser 145 150 155	479
	gtt tcc gag gag gag tat ctc agg atg gtc gag ctg aag acc gga gtg Val Ser Glu Glu Glu Tyr Leu Arg Met Val Glu Leu Lys Thr Gly Val 160 165 170 175	527
10	ctg att gca gct tct gca gca tta cct gcg gtg ctt ttt ggg gag agc Leu Ile Ala Ala Ser Ala Ala Leu Pro Ala Val Leu Phe Gly Glu Ser 180 185 190	575
15	gag gaa att gta aag gcg ctg tgg gac tac gga gtt ctt agc ggt att Glu Glu Ile Val Lys Ala Leu Trp Asp Tyr Gly Val Leu Ser Gly Ile 195 200 205	623
20	ggc ttc cag atc cag gac gac ctg ctt gac ctg act gag gag acc gga Gly Phe Gln Ile Gln Asp Asp Leu Leu Asp Leu Thr Glu Glu Thr Gly 210 215 220	671
25	aag gac tgg gga agc gac ctg ctt aaa ggg aag aaa acc ctg att gtc Lys Asp Trp Gly Ser Asp Leu Leu Lys Gly Lys Lys Thr Leu Ile Val 225 230 235	719
30	ata aag gcg ttc gaa aag gga gtg aag cta aag acg ttt gga aag gaa Ile Lys Ala Phe Glu Lys Gly Val Lys Leu Lys Thr Phe Gly Lys Glu 240 245 250 255	767
35	aag gcg gac gtc tct gag att aga gat gat atc gaa aag tta aga gag Lys Ala Asp Val Ser Glu Ile Arg Asp Asp Ile Glu Lys Leu Arg Glu 260 265 270	815
40	tgt ggt gcg att gat tac gct gcc agc atg gca aga aag atg gct gaa Cys Gly Ala Ile Asp Tyr Ala Ala Ser Met Ala Arg Lys Met Ala Glu 275 280 285	863
45	gag gcg aaa aga aag ctc gaa gtt ctg cct gaa agc aaa gcc aag gaa Glu Ala Lys Arg Lys Leu Glu Val Leu Pro Glu Ser Lys Ala Lys Glu 290 300	911
50	aca ctg ctg gaa ctt acc gac ttc ttg gtt aca aga aaa aag tga Thr Leu Leu Glu Leu Thr Asp Phe Leu Val Thr Arg Lys Lys 305 310 315	956
55	aagctt	962
60	<210> 35 <211> 317 <212> PRT <213> Archaeoglobus fulgidus	
65	<400> 35 Met Val Lys Glu Glu Ile Ala Lys Arg Ala Glu Ile Ile Asn Lys Ala 1 5 10 15	
70	Ile Glu Glu Leu Leu Pro Glu Arg Glu Pro Ile Gly Leu Tyr Lys Ala 20 25 30	
	Ala Arg His Leu Ile Lys Ala Gly Gly Lys Arg Leu Arg Pro Val Ile 35 40 45	



5 Ser Leu Leu Ala Val Glu Ala Leu Gly Lys Asp Tyr Arg Lys Ile Ile  
     50                    55                    60  
 10 Pro Ala Ala Val Ser Ile Glu Thr Ile His Asn Phe Thr Leu Val His  
     65                    70                    75                    80  
 15 Asp Asp Ile Met Asp Arg Asp Glu Met Arg Arg Gly Val Pro Thr Val  
                     85                    90                    95  
 20 Phe Ala Glu Ala Phe Lys Leu Leu Thr Lys Cys Asp Val Glu Ser Glu  
                     115                    120                    125  
 25 Gly Ile Arg Lys Ala Thr Glu Met Leu Ser Asp Val Cys Ile Lys Ile  
     130                    135                    140  
 30 Cys Glu Gly Gln Tyr Tyr Asp Met Ser Phe Glu Lys Lys Glu Ser Val  
     145                    150                    155                    160  
 35 Ser Glu Glu Glu Tyr Leu Arg Met Val Glu Leu Lys Thr Gly Val Leu  
                     165                    170                    175  
 40 Ile Ala Ala Ser Ala Ala Leu Pro Ala Val Leu Phe Gly Glu Ser Glu  
                     180                    185                    190  
 45 Glu Ile Val Lys Ala Leu Trp Asp Tyr Gly Val Leu Ser Gly Ile Gly  
     195                    200                    205  
 50 Phe Gln Ile Gln Asp Asp Leu Leu Asp Leu Thr Glu Glu Thr Gly Lys  
     210                    215                    220  
 55 Asp Trp Gly Ser Asp Leu Leu Lys Gly Lys Lys Thr Leu Ile Val Ile  
     225                    230                    235                    240  
 60 Lys Ala Phe Glu Lys Gly Val Lys Leu Lys Thr Phe Gly Lys Glu Lys  
                     245                    250                    255  
 65 Ala Asp Val Ser Glu Ile Arg Asp Asp Ile Glu Lys Leu Arg Glu Cys  
                     260                    265                    270  
 70 Gly Ala Ile Asp Tyr Ala Ala Ser Met Ala Arg Lys Met Ala Glu Glu  
     275                    280                    285  
 Ala Lys Arg Lys Leu Glu Val Leu Pro Glu Ser Lys Ala Lys Glu Thr  
     290                    295                    300  
 Leu Leu Glu Leu Thr Asp Phe Leu Val Thr Arg Lys Lys  
     305                    310                    315

<210> 36  
 <211> 1293  
 5 <212> DNA  
 <213> Archaeoglobus fulgidus  
 10 <220>  
 <221> CDS  
 15 <222> (206)..(1159)  
 <223>  
 20 <400> 36  
 taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgcaat tgggtaccgg 60  
 gccccccctc gacgccgtcg ttcaatgaga atggataaga ggctcgtggg attgacgtga 120  
 25 gggggcaggg atggctatat ttctggggagc gaactccggg cgaggatcta gttgtaggga 180  
 gggattcatg acaccacaaa cagcc atg gtg aag gag gaa ata gcg aaa agg 232  
 Met Val Lys Glu Glu Ile Ala Lys Arg  
 30 1 5  
 gcc gaa ata atc aac aaa gcc att gaa gag ctt ctg ccc gaa agg gag 280  
 Ala Glu Ile Ile Asn Lys Ala Ile Glu Glu Leu Leu Pro Glu Arg Glu  
 35 10 15 20 25  
 ccg att gga ctc tac aaa gcc gca agg cat ctg atc aaa gca ggt ggc 328  
 Pro Ile Gly Leu Tyr Lys Ala Ala Arg His Leu Ile Lys Ala Gly Gly  
 30 35 40  
 aag agg cta agg cct gta ata agc ctc tta gca gtc gaa gcc ctt ggg 376  
 Lys Arg Leu Arg Pro Val Ile Ser Leu Leu Ala Val Glu Ala Leu Gly  
 40 45 50  
 aaa gac tac aga aag att atc ccg gct gct gtc agc att gaa aca atc 424  
 Lys Asp Tyr Arg Lys Ile Ile Pro Ala Ala Val Ser Ile Glu Thr Ile  
 45 60 70  
 cac aac ttc acc ctc gtg cat gac gac ata atg gac agg gac gag atg 472  
 His Asn Phe Thr Leu Val His Asp Asp Ile Met Asp Arg Asp Glu Met  
 50 75 80 85  
 agg agg gga gtt ccg acg gta cac agg gtt tat ggg gaa gcg acg gcc 520  
 Arg Arg Gly Val Pro Thr Val His Arg Val Tyr Gly Glu Ala Thr Ala  
 55 90 95 100 105  
 att tta gca ggc gac aca ctc ttt gct gaa gcc ttc aag ctg ctg aca 568  
 Ile Leu Ala Gly Asp Thr Leu Phe Ala Glu Ala Phe Lys Leu Leu Thr  
 110 115 120  
 aag tgc gat gtt gag agc gag gga atc aga aaa gct aca gaa atg ctt 616  
 Lys Cys Asp Val Glu Ser Glu Gly Ile Arg Lys Ala Thr Glu Met Leu  
 60 125 130 135  
 tcg gac gtt tgc ata aaa ata tgc gag ggg cag tac tac gac atg agc 664  
 Ser Asp Val Cys Ile Lys Ile Cys Glu Gly Gln Tyr Tyr Asp Met Ser  
 65 140 145 150  
 ttt gag aaa aag gag agc gtt tcc gag gag gag tat ctc agg atg gtc 712  
 Phe Glu Lys Lys Glu Ser Val Ser Glu Glu Glu Tyr Leu Arg Met Val  
 70 155 160 165

## 45

5	gag ctg aag acc gga gtg ctg att gca gct tct gca gca tta cct gcg Glu Leu Lys Thr Gly Val Leu Ile Ala Ala Ser Ala Ala Leu Pro Ala 170 175 180 185	760
10	gtg ctt ttt ggg gag agc gag gaa att gta aag gcg ctg tgg gac tac Val Leu Phe Gly Glu Ser Glu Glu Ile Val Lys Ala Leu Trp Asp Tyr 190 195 200	808
15	gga gtt ctt agc ggt att ggc ttc cag atc cag gac gac ctg ctt gac Gly Val Leu Ser Gly Ile Gly Phe Gln Ile Gln Asp Asp Leu Leu Asp 205 210 215	856
20	ctg act gag gag acc gga aag gac tgg gga agc gac ctg ctt aaa ggg Leu Thr Glu Glu Thr Gly Lys Asp Trp Gly Ser Asp Leu Leu Lys Gly 220 225 230	904
25	aag aaa acc ctg att gtc ata aag gcg ttc gaa aag gga gtg aag cta Lys Lys Thr Leu Ile Val Ile Lys Ala Phe Glu Lys Gly Val Lys Leu 235 240 245	952
30	aag acg ttt gga aag gaa aag gcg gac gtc tct gag att aga gat gat Lys Thr Phe Gly Lys Glu Lys Ala Asp Val Ser Glu Ile Arg Asp Asp 250 255 260 265	1000
35	atc gaa aag tta aga gag tgt ggt gcg att gat tac gct gcc agc atg Ile Glu Lys Leu Arg Glu Cys Gly Ala Ile Asp Tyr Ala Ala Ser Met 270 275 280	1048
40	gca aga aag atg gct gaa gag gcg aaa aga aag ctc gaa gtt ctg cct Ala Arg Lys Met Ala Glu Glu Ala Lys Arg Lys Leu Glu Val Leu Pro 285 290 295	1096
45	gaa agc aaa gcc aag gaa aca ctg ctg gaa ctt acc gac ttc ttg gtt Glu Ser Lys Ala Lys Glu Thr Leu Leu Glu Leu Thr Asp Phe Leu Val 300 305 310	1144
50	aca aga aaa aag tga aagcttcaat tgcattgctct agatgatcaa agaattcctg Thr Arg Lys Lys 315	1199
55	gcctagtcta taggagggtt tgaaaagaaa ggagcaataa tcattttctt gttctatcaa gaggggtgcta ttgctccttt ctttttttct cgag	1259 1293
60	<210> 37 <211> 317 <212> PRT <213> Archaeoglobus fulgidus	
65	<400> 37 Met Val Lys Glu Glu Ile Ala Lys Arg Ala Glu Ile Ile Asn Lys Ala 1 5 10 15 Ile Glu Glu Leu Leu Pro Glu Arg Glu Pro Ile Gly Leu Tyr Lys Ala 20 25 30	
70	Ala Arg His Leu Ile Lys Ala Gly Gly Lys Arg Leu Arg Pro Val Ile 35 40 45	

## 46

Ser Leu Leu Ala Val Glu Ala Leu Gly Lys Asp Tyr Arg Lys Ile Ile  
 50 55 60

5 Pro Ala Ala Val Ser Ile Glu Thr Ile His Asn Phe Thr Leu Val His  
 65 70 75 80

10 Asp Asp Ile Met Asp Arg Asp Glu Met Arg Arg Gly Val Pro Thr Val  
 85 90 95

15 His Arg Val Tyr Gly Glu Ala Thr Ala Ile Leu Ala Gly Asp Thr Leu  
 100 105 110

Phe Ala Glu Ala Phe Lys Leu Leu Thr Lys Cys Asp Val Glu Ser Glu  
 115 120 125

20 Gly Ile Arg Lys Ala Thr Glu Met Leu Ser Asp Val Cys Ile Lys Ile  
 130 135 140

25 Cys Glu Gly Gln Tyr Tyr Asp Met Ser Phe Glu Lys Lys Glu Ser Val  
 145 150 155 160

30 Ser Glu Glu Glu Tyr Leu Arg Met Val Glu Leu Lys Thr Gly Val Leu  
 165 170 175

35 Ile Ala Ala Ser Ala Ala Leu Pro Ala Val Leu Phe Gly Glu Ser Glu  
 180 185 190

40 Glu Ile Val Lys Ala Leu Trp Asp Tyr Gly Val Leu Ser Gly Ile Gly  
 195 200 205

Phe Gln Ile Gln Asp Asp Leu Leu Asp Leu Thr Glu Glu Thr Gly Lys  
 210 215 220

45 Asp Trp Gly Ser Asp Leu Leu Lys Gly Lys Lys Thr Leu Ile Val Ile  
 225 230 235 240

50 Lys Ala Phe Glu Lys Gly Val Lys Leu Lys Thr Phe Gly Lys Glu Lys  
 245 250 255

55 Ala Asp Val Ser Glu Ile Arg Asp Asp Ile Glu Lys Leu Arg Glu Cys  
 260 265 270

60 Gly Ala Ile Asp Tyr Ala Ala Ser Met Ala Arg Lys Met Ala Glu Glu  
 275 280 285

Ala Lys Arg Lys Leu Glu Val Leu Pro Glu Ser Lys Ala Lys Glu Thr  
 290 295 300

65 Leu Leu Glu Leu Thr Asp Phe Leu Val Thr Arg Lys Lys  
 305 310 315

<210> 38  
<211> 35  
5 <212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
10  
<220>  
<221> primer\_bind  
15 <222> (1)..(35)  
<223>  
20  
<400> 38  
gagctcttca ttatttcgat tttgatttcg tgacc 35  
25 <210> 39  
<211> 38  
<212> DNA  
30 <213> Künstliche Sequenz  
35 <220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(38)  
40 <223>  
45 <400> 39  
aagcttggtt gatcagaaga agaagaagaa gatgaact 38  
50 <210> 40  
<211> 647  
<212> DNA  
55 <213> Arabidopsis thaliana  
60 <220>  
<221> Promotor  
<222> (1)..(647)  
65 <223>  
70 <400> 40  
gagctcttca ttatttcgat tttgatttcg tgaccagcga acgcagaata ccttggtgtg 60

	taataacttta cccgtgtaaa tcaaaaacaa aaaggctttt gagctttttg tagttgaatt	120
5	tctctgggtg atcttttctg tacagattca tatactctgca gagacgatat cattgattat	180
	ttgagcttct tttgaactat ttcgtgtaat ttgggatgag agctctatgt atgtgtgtaa	240
	actttgaaga caacaagaaa ggtaacaagt gagggagggg tgactccatg tcaaaataga	300
10	tgtcataaga ggcccatcaa taagtgttg agcccatag ctagcccagt aactaccaga	360
	ttgtgagatg gatgtgtgaa cagttttttt tttgatgtag gactgaaatg tgaacaacag	420
15	gcgcatgaaa ggctaaaatta ggacaatgat aagcagaaat aacttatcct ctctaacact	480
	tggcctcaca ttgcccttca cacaatccac acacatccaa tcacaacctc atcatatata	540
	tcccgttaat ctttttttct ttgatctttt tttttttgct tattattttt ttgactttga	600
20	tctcccatca gttcatcttc ttcttcttct tctgatcaac caagctt	647

&lt;210&gt; 41

25 &lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

30 &lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

35 &lt;221&gt; primer\_bind

&lt;222&gt; (1)..(28)

40 &lt;223&gt;

&lt;400&gt; 41

45 gagctcactc actgatttcc attgcttg

28

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 23

50 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

55

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Primer

60 &lt;222&gt; (1)..(23)

&lt;223&gt;

65

&lt;400&gt; 42

aagcttttgt tgaagagatt tgg

23

70

<210> 43  
<211> 37  
5 <212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
10  
<220>  
<221> primer\_bind  
15 <222> (1)..(37)  
<223>  
20  
<400> 43  
cgccggttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc 37  
25 <210> 44  
<211> 34  
<212> DNA  
30 <213> Künstliche Sequenz  
35 <220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(34)  
40 <223>  
45 <400> 44  
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac 34  
50 <210> 45  
<211> 777  
<212> DNA  
55 <213> Arabidopsis thaliana  
60  
<220>  
<221> Promotor  
<222> (1)..(777)  
65 <223>  
70 <400> 45  
gagctcactc actgatttcc attgottgaa aattgatgat gaactaagat caatccatgt 60

tagtttcaaa acaacagtaa ctgtggccaa cttagttttg aaacaacact aactgggtcga 120  
 5 agcaaaaaga aaaaagagtt tcatcatata tctgatttga tggactgttt ggagtttagga 180  
 ccaaacatta tctacaaaca aagacttttc tctaacttg tgattccttc ttaaacccta 240  
 ggggtaatat tctattttcc aaggatcttt agttaaaggg aaatccggga aattattgta 300  
 10 atcatttggg gaaacatata aaagatttga gttagatgga agtgacgatt aatccaaaca 360  
 tatatatctc tttcttctta tttcccaa ataacagacaa aagtagaata ttggctttta 420  
 15 acaccaatat aaaaacttgc ttcacaccta aacacttttg tttacttttag ggtaagtgca 480  
 aaaagccaac caaatccacc tgcactgatt tgacgtttac aaacgccgtt aagtcgatgt 540  
 ccgttgattt aaacagtgtc ttgtaattaa aaaaatcagt ttacataaat ggaaaattta 600  
 20 tcaacttagtt ttcatcaact tctgaactta cttttcatgg attaggcaat actttccatt 660  
 tttagtaact caagtggacc ctttacttct tcaactccat ctctctcttt ctatttcact 720  
 25 tctttcttct cattatatct cttgtcctct ccaccaaata tcttcaacaa aaagctt 777  
  
 <210> 46  
 <211> 804  
 30 <212> DNA  
 <213> Synechococcus WH8102  
  
 35 <220>  
 <221> CDS  
 40 <222> (1)..(804)  
 <223>  
  
 45 <400> 46  
 atg aaa acg aca aga tct att tcg tgg cca tcg act tgc tgg cat cac 48  
 Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His  
 1 5 10 15  
 50 cag ccg agt tgc tca agc tgg gtg gca aat gag ttc agc cct cag gcc 96  
 Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala  
 20 25 30  
 55 ctc aaa ggg ttg gct ctg gct ggt ctg att gga tca gcc tgg ctg ctc 144  
 Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu  
 35 40 45  
 60 tcc ctg ggc ctg agc tac acc ctg cca ctt gat cag acg cct ggg ctg 192  
 Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu  
 50 55 60  
 65 ttg att ggc agc ttg att ctg ctc aga gca ttt ctg cac acc ggg ctg 240  
 Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu  
 65 70 75 80  
 70 ttc atc gtt gcc cac gat tcc atg cac gcc agt ctg gtt ccg ggt cat 288  
 Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His  
 85 90 95



	ccc gga ttg aac cgc tgg atc ggc aaa gtg tat ttg ttg gtg tat gca	336
	Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala	
	100 105 110	
5	ggc ttg tct tat gag cgt tgt tcc cgc aac cac aga cgt cat cac ctg	384
	Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu	
	115 120 125	
10	gca ccg gag acg ttc cag gat cct gac tac caa cgt tgc acc aat aac	432
	Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn	
	130 135 140	
15	aac atc cta gat tgg tat gtt cac ttc atg ggc aac tat ctg ggc atg	480
	Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met	
	145 150 155 160	
20	cgg caa ctg tta aat cta agc tgt ctt tgg ctg gcg cta atc att ctc	528
	Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu	
	165 170 175	
25	aac ggt tct gat ctc cct gct cag atc atg cat ctg ctg ttg ttc agc	576
	Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser	
	180 185 190	
30	gtt ctg ccg ttg atc atc agt tcc tgt caa ttg ttt cta gtg gga acc	624
	Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr	
	195 200 205	
35	tgg tta ccc cac cga cgt ggg gcc acg aca cga ccg ggc gtg aca acg	672
	Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr	
	210 215 220	
40	cgc agc ctg gct ttg cat cca gcc ctc tct ttc gca gct tgt tac aac	720
	Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn	
	225 230 235 240	
45	ttt ggc tat cat cgt gaa cat cat gaa tcg cct tcc aca ccc tgg ttt	768
	Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe	
	245 250 255	
50	cag ctg cca caa ctt cga aat gaa tca ttc act tga	804
	Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr	
	260 265	
55	<210> 47	
60	<211> 267	
	<212> PRT	
	<213> Synechococcus WH8102	
65	<400> 47	
70	Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His	
	1 5 10 15	
	Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala	
	20 25 30	
	Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu	
	35 40 45	

## 52

Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu  
 50 55 60

5 Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu  
 65 70 75 80

10 Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His  
 85 90 95

15 Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala  
 100 105 110

20 Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu  
 115 120 125

25 Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn  
 130 135 140

30 Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met  
 145 150 155 160

35 Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu  
 165 170 175

40 Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser  
 180 185 190

45 Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr  
 195 200 205

50 Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr  
 210 215 220

55 Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn  
 225 230 235 240

60 Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe  
 245 250 255

65 Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr  
 260 265

70 <210> 48  
 <211> 804  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Variante  
 <220>  
 <221> CDS

&lt;222&gt; (1) .. (804)

&lt;223&gt;

5

&lt;400&gt; 48

10	atg aaa acg aca aga tct att tcg tgg cca tcg act tgc tgg cat cac Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His	48
	1 5 10 15	
15	cag ccg agt tgc tca agc tgg gtg gca aat gag ttc agc cct cag gcc Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala	96
	20 25 30	
20	ctc aaa ggg ttg gct ctg gct ggt ctg att gga tca gcc tgg ctg ctc Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu	144
	35 40 45	
25	tcc ctg ggc ctg agc tac acc ctg cca ctt gat cag acg cct ggg ctg Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu	192
	50 55 60	
30	ttg att ggc agc ttg att ctg tgg cag acc ttt ctg cac acc ggg ctg Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Trp Gln Thr Phe Leu His Thr Gly Leu	240
	65 70 75 80	
35	ttc atc gtt gcc cac gat tcc atg cac gcc agt ctg gtt ccg ggt cat Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His	288
	85 90 95	
40	ccc gga ttg aac cgc tgg atc ggc aaa gtg tat ttg ttg gtg tat gca Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala	336
	100 105 110	
45	ggc ttg tct tat gag cgt tgt tcc cgc aac cac aga cgt cat cac ctg Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu	384
	115 120 125	
50	gca ccg gag acg ttc cag gat cct gac tac caa cgt tgc acc aat aac Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn	432
	130 135 140	
55	aac atc cta gat tgg tat gtt cac ttc atg ggc aac tat ctg ggc atg Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met	480
	145 150 155 160	
60	cgg caa ctg tta aat cta agc tgt ctt tgg ctg gcg cta atc att ctc Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu	528
	165 170 175	
65	aac ggt tct gat ctc cct gct cag atc atg cat ctg ctg ttg ttc agc Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser	576
	180 185 190	
70	gtt ctg ccg ttg atc atc agt tcc tgt caa ttg ttt cta gtg gga acc Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr	624
	195 200 205	
75	tgg tta ccc cac cga cgt ggg gcc acg aca cga ccg ggc gtg aca acg Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr	672
	210 215 220	
80	cgc agc ctg gct ttg cat cca gcc ctc tct ttc gca gct tgt tac aac Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn	720
	225 230 235 240	
85	ttt ggc tat cat cgt gaa cat cat gaa tcg cct tcc aca ccc tgg ttt Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe	768
	245 250 255	

cag ctg cca caa ctt cga aat gaa tca ttc act tga  
 Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr  
                   260                  265

5

<210> 49

<211> 267

10

<212> PRT

<213> Künstliche Variante

15

<400> 49

20

Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His  
 1                  5                  10                  15

Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala  
                   20                  25                  30

25

Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu  
                   35                  40                  45

30

Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu  
                   50                  55                  60

35

Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Trp Gln Thr Phe Leu His Thr Gly Leu  
                   65                  70                  75                  80

40

Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His  
                   85                  90                  95

45

Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala  
                   100                  105                  110

Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu  
                   115                  120                  125

50

Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn  
                   130                  135                  140

55

Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met  
                   145                  150                  155                  160

60

Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu  
                   165                  170                  175

65

Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser  
                   180                  185                  190

Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr  
                   195                  200                  205

70

Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr  
 210 215 220

5 Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn  
 225 230 235 240

10 Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe  
 245 250 255

15 Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr  
 260 265

20 <210> 50  
 <211> 804  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Variante

25 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(804)  
 <223>

35 <400> 50  
 atg aaa acg aca aga tct att tcg tgg cca tcg act tgc tgg cat cac 48  
 Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His  
 1 5 10 15

40 cag ccg agt tgc tca agc tgg gtg gca aat gag ttc agc cct cag gcc 96  
 Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala  
 20 25 30

45 ctc aaa ggg ttg gct ctg gct ggt ctg att gga tca gcc tgg ctg ctc 144  
 Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu  
 35 40 45

50 tcc ctg ggc ctg agc tac acc ctg cca ctt gat cag acg cct ggg ctg 192  
 Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu  
 50 55 60

55 ttg att ggc agc ttg att ctg ctc aga gca ttt ctg cac acc ggg ctg 240  
 Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu  
 65 70 75 80

60 ttc atc gtt gcc cac gat tcc atg cac gcc agt ctg gtt ccg ggt cat 288  
 Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His  
 85 90 95

65 ccc gga ttg aac cgc tgg atc ggc aaa gtg tat ttg ttg gtg tat gca 336  
 Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala  
 100 105 110

70 ggc ttg tct tat gag cgt tgt tcc cgc aac cac aga cgt cat cac gga 384  
 Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Gly  
 115 120 125

cat cct ggt act gat tta gat cct gac tac caa cgt tgc acc aat aac 432

## 56

	His	Pro	Gly	Thr	Asp	Leu	Asp	Pro	Asp	Tyr	Gln	Arg	Cys	Thr	Asn	Asn	
	130						135					140					
5	aac	atc	cta	gat	tgg	tat	gtt	cac	ttc	atg	ggc	aac	tat	ctg	ggc	atg	480
	Asn	Ile	Leu	Asp	Trp	Tyr	Val	His	Phe	Met	Gly	Asn	Tyr	Leu	Gly	Met	
	145					150					155					160	
10	cgg	caa	ctg	tta	aat	cta	agc	tgt	ctt	tgg	ctg	gcg	cta	atc	att	ctc	528
	Arg	Gln	Leu	Leu	Asn	Leu	Ser	Cys	Leu	Trp	Leu	Ala	Leu	Ile	Ile	Leu	
					165					170					175		
15	aac	ggt	tct	gat	ctc	cct	gct	cag	atc	atg	cat	ctg	ctg	ttg	ttc	agc	576
	Asn	Gly	Ser	Asp	Leu	Pro	Ala	Gln	Ile	Met	His	Leu	Leu	Leu	Phe	Ser	
				180					185					190			
20	gtt	ctg	ccg	ttg	atc	atc	agt	tcc	tgt	caa	ttg	ttt	cta	gtg	gga	acc	624
	Val	Leu	Pro	Leu	Ile	Ile	Ser	Ser	Cys	Gln	Leu	Phe	Leu	Val	Gly	Thr	
			195					200					205				
25	tgg	tta	ccc	cac	cga	cgt	ggg	gcc	acg	aca	cga	ccg	ggc	gtg	aca	acg	672
	Trp	Leu	Pro	His	Arg	Arg	Gly	Ala	Thr	Thr	Arg	Pro	Gly	Val	Thr	Thr	
		210				215						220					
30	cgc	agc	ctg	gct	ttg	cat	cca	gcc	ctc	tct	ttc	gca	gct	tgt	tac	aac	720
	Arg	Ser	Leu	Ala	Leu	His	Pro	Ala	Leu	Ser	Phe	Ala	Ala	Cys	Tyr	Asn	
	225					230					235					240	
35	ttt	ggc	tat	cat	cgt	gaa	cat	cat	gaa	tgc	cct	tcc	aca	ccc	tgg	ttt	768
	Phe	Gly	Tyr	His	Arg	Glu	His	His	Glu	Ser	Pro	Ser	Thr	Pro	Trp	Phe	
					245				250						255		
40	cag	ctg	cca	caa	ctt	cga	aat	gaa	tca	ttc	act	tga					804
	Gln	Leu	Pro	Gln	Leu	Arg	Asn	Glu	Ser	Phe	Thr						
				260					265								
45	<210>	51															
50	<211>	267															
55	<212>	PRT															
60	<213>	Künstliche Variante															
65	<400>	51															
70	Met	Lys	Thr	Thr	Arg	Ser	Ile	Ser	Trp	Pro	Ser	Thr	Cys	Trp	His	His	
	1				5					10					15		
75	Gln	Pro	Ser	Cys	Ser	Ser	Trp	Val	Ala	Asn	Glu	Phe	Ser	Pro	Gln	Ala	
				20					25					30			
80	Leu	Lys	Gly	Leu	Ala	Leu	Ala	Gly	Leu	Ile	Gly	Ser	Ala	Trp	Leu	Leu	
			35					40					45				
85	Ser	Leu	Gly	Leu	Ser	Tyr	Thr	Leu	Pro	Leu	Asp	Gln	Thr	Pro	Gly	Leu	
		50					55					60					
90	Leu	Ile	Gly	Ser	Leu	Ile	Leu	Leu	Arg	Ala	Phe	Leu	His	Thr	Gly	Leu	
	65					70				75						80	
95	Phe	Ile	Val	Ala	His	Asp	Ser	Met	His	Ala	Ser	Leu	Val	Pro	Gly	His	
					85					90					95		

5 Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala  
 100 105 110  
 Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Gly  
 115 120 125  
 10 His Pro Gly Thr Asp Leu Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn  
 130 135 140  
 15 Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met  
 145 150 155 160  
 20 Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu  
 165 170 175  
 25 Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser  
 180 185 190  
 Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr  
 195 200 205  
 30 Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr  
 210 215 220  
 35 Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn  
 225 230 235 240  
 40 Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe  
 245 250 255  
 45 Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr  
 260 265  
 <210> 52  
 <211> 690  
 <212> DNA  
 <213> Nodularia spumigena NSOR10  
 55 <220>  
 <221> CDS  
 60 <222> (1)..(690)  
 <223>  
 65 <400> 52  
 atg gcg atc gcc att att agt ata tgg gct atc agc cta ggt ttg tta  
 Met Ala Ile Ala Ile Ile Ser Ile Trp Ala Ile Ser Leu Gly Leu Leu  
 1 5 10 15

	ctt tat att gat ata tcc caa ttc aag ttt tgg atg ttg tta ccg ctc	96
	Leu Tyr Ile Asp Ile Ser Gln Phe Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Leu	
	20 25 30	
5	ata ttt tgg caa aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca gct cat	144
	Ile Phe Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His	
	35 40 45	
10	gat gcc atg cat ggg gta gtt ttt ccc aaa aat ccc aaa atc aac cat	192
	Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Lys Asn Pro Lys Ile Asn His	
	50 55 60	
15	ttc att ggc tca ttg tgc ctg ttt ctt tat ggt ctt tta cct tat caa	240
	Phe Ile Gly Ser Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln	
	65 70 75 80	
20	aaa ctt tta aaa aag cat tgg cta cat cac cat aat cca gcc agt gaa	288
	Lys Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Glu	
	85 90 95	
25	aca gat cca gat ttt cac aac ggg aag cag aaa aac ttt ttt gct tgg	336
	Thr Asp Pro Asp Phe His Asn Gly Lys Gln Lys Asn Phe Phe Ala Trp	
	100 105 110	
30	tat tta tat ttt atg aag cgt tac tgg agt tgg tta caa att atc aca	384
	Tyr Leu Tyr Phe Met Lys Arg Tyr Trp Ser Trp Leu Gln Ile Ile Thr	
	115 120 125	
35	tta atg att att tat aac tta cta aaa tat ata tgg cat ttt cca gag	432
	Leu Met Ile Ile Tyr Asn Leu Leu Lys Tyr Ile Trp His Phe Pro Glu	
	130 135 140	
40	gat aat atg act tat ttt tgg gta gtt ccc tca att tta agt tct tta	480
	Asp Asn Met Thr Tyr Phe Trp Val Val Pro Ser Ile Leu Ser Ser Leu	
	145 150 155 160	
45	caa tta ttt tat ttt gga act ttt cta ccc cac agt gag cct gta gaa	528
	Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Val Glu	
	165 170 175	
50	ggt tat aaa gag cct cat cgt tcc caa act att agc cgt ccc att tgg	576
	Gly Tyr Lys Glu Pro His Arg Ser Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp	
	180 185 190	
55	tgg tca ttt ata act tgt tac cat ttt ggt tat cat tac gaa cat cat	624
	Trp Ser Phe Ile Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Tyr Glu His His	
	195 200 205	
60	gaa tac ccc cat gtt cct tgg tgg caa tta cca gaa att tat aaa atg	672
	Glu Tyr Pro His Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Met	
	210 215 220	
65	tct aaa tca aat ttg tga	690
	Ser Lys Ser Asn Leu	
	225	
70	<210> 53	
	<211> 229	
	<212> PRT	
	<213> Nodularia spumigena NSOR10	
	<400> 53	



## 59

Met Ala Ile Ala Ile Ile Ser Ile Trp Ala Ile Ser Leu Gly Leu Leu  
 1 5 10 15  
 5 Leu Tyr Ile Asp Ile Ser Gln Phe Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Leu  
 20 25 30  
 10 Ile Phe Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His  
 35 40 45  
 15 Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Lys Asn Pro Lys Ile Asn His  
 50 55 60  
 20 Phe Ile Gly Ser Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln  
 65 70 75 80  
 25 Lys Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Glu  
 85 90 95  
 30 Thr Asp Pro Asp Phe His Asn Gly Lys Gln Lys Asn Phe Phe Ala Trp  
 100 105 110  
 35 Tyr Leu Tyr Phe Met Lys Arg Tyr Trp Ser Trp Leu Gln Ile Ile Thr  
 115 120 125  
 40 Leu Met Ile Ile Tyr Asn Leu Leu Lys Tyr Ile Trp His Phe Pro Glu  
 130 135 140  
 45 Asp Asn Met Thr Tyr Phe Trp Val Val Pro Ser Ile Leu Ser Ser Leu  
 145 150 155 160  
 50 Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Val Glu  
 165 170 175  
 55 Gly Tyr Lys Glu Pro His Arg Ser Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp  
 180 185 190  
 60 Trp Ser Phe Ile Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Tyr Glu His His  
 195 200 205  
 65 Glu Tyr Pro His Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Met  
 210 215 220  
 70 Ser Lys Ser Asn Leu  
 225  
 <210> 54  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <221> Primer  
 5 <222> (1)..(37)  
 <223>

10 <400> 54 37  
 gcgcatgcat ctagaaatga tccagttaga acaacca

15 <210> 55  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 20 <213> Künstliche Sequenz

25 <220>  
 <221> Primer  
 30 <222> (1)..(37)  
 <223>

35 <400> 55 37  
 gcgcatgctc tagactatatt tgctttgtaa atttctg

40 <210> 56  
 <211> 792  
 <212> DNA  
 45 <213> Nostoc punctiforme ATCC 29133

50 <220>  
 <221> CDS  
 55 <222> (5)..(775)  
 <223>

60 <400> 56 49  
 gcgc atg cat cta gaa atg atc cag tta gaa caa cca ctc agt cat caa  
 Met His Leu Glu Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln  
 1 5 10 15

65 gca aaa ctg act cca gta ctg aga agt aaa tct cag ttt aag ggg ctt 97  
 Ala Lys Leu Thr Pro Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu  
 20 25 30

70 ttc att gct att gtc att gtt agc gca tgg gtc att agc ctg agt tta 145

## 61

	Phe	Ile	Ala	Ile	Val	Ile	Val	Ser	Ala	Trp	Val	Ile	Ser	Leu	Ser	Leu		
				35					40					45				
5	tta	ctt	tcc	ctt	gac	atc	tca	aag	cta	aaa	ttt	tgg	atg	tta	ttg	cct		193
	Leu	Leu	Ser	Leu	Asp	Ile	Ser	Lys	Leu	Lys	Phe	Trp	Met	Leu	Leu	Pro		
			50					55					60					
10	gtt	ata	cta	tgg	caa	aca	ttt	tta	tat	acg	gga	tta	ttt	att	aca	tct		241
	Val	Ile	Leu	Trp	Gln	Thr	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Ser		
		65					70				75							
15	cat	gat	gcc	atg	cat	ggc	gta	gta	ttt	ccc	caa	aac	acc	aag	att	aat		289
	His	Asp	Ala	Met	His	Gly	Val	Val	Phe	Pro	Gln	Asn	Thr	Lys	Ile	Asn		
	80					85					90					95		
20	cat	ttg	att	gga	aca	ttg	acc	cta	tcc	ctt	tat	ggg	ctt	tta	cca	tat		337
	His	Leu	Ile	Gly	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Leu	Tyr	Gly	Leu	Leu	Pro	Tyr		
					100					105					110			
25	caa	aaa	cta	ttg	aaa	aaa	cat	tgg	tta	cac	cac	cac	aat	cca	gca	agc		385
	Gln	Lys	Leu	Leu	Lys	Lys	His	Trp	Leu	His	His	His	Asn	Pro	Ala	Ser		
				115					120					125				
30	tca	ata	gac	ccg	gat	ttt	cac	aat	ggg	aaa	cac	caa	agt	ttc	ttt	gct		433
	Ser	Ile	Asp	Pro	Asp	Phe	His	Asn	Gly	Lys	His	Gln	Ser	Phe	Phe	Ala		
			130					135					140					
35	tgg	tat	ttt	cat	ttt	atg	aaa	ggg	tac	tgg	agt	tgg	ggg	caa	ata	att		481
	Trp	Tyr	Phe	His	Phe	Met	Lys	Gly	Tyr	Trp	Ser	Trp	Gly	Gln	Ile	Ile		
		145					150					155						
40	gcg	ttg	act	att	att	tat	aac	ttt	gct	aaa	tac	ata	ctc	cat	atc	cca		529
	Ala	Leu	Thr	Ile	Ile	Tyr	Asn	Phe	Ala	Lys	Tyr	Ile	Leu	His	Ile	Pro		
	160					165					170					175		
45	agt	gat	aat	cta	act	tac	ttt	tgg	gtg	cta	ccc	tcg	ctt	tta	agt	tca		577
	Ser	Asp	Asn	Leu	Thr	Tyr	Phe	Trp	Val	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Ser	Ser		
					180					185					190			
50	tta	caa	tta	ttc	tat	ttt	ggg	act	ttt	tta	ccc	cat	agt	gaa	cca	ata		625
	Leu	Gln	Leu	Phe	Tyr	Phe	Gly	Thr	Phe	Leu	Pro	His	Ser	Glu	Pro	Ile		
				195					200					205				
55	ggg	ggg	tat	gtt	cag	cct	cat	tgt	gcc	caa	aca	att	agc	cgt	cct	att		673
	Gly	Gly	Tyr	Val	Gln	Pro	His	Cys	Ala	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg	Pro	Ile		
			210					215					220					
60	tgg	tgg	tca	ttt	atc	acg	tgc	tat	cat	ttt	ggc	tac	cac	gag	gaa	cat		721
	Trp	Trp	Ser															

<400> 57

5 Met His Leu Glu Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala  
1 5 10 15

10 Lys Leu Thr Pro Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe  
20 25 30

15 Ile Ala Ile Val Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu  
35 40 45

20 Leu Ser Leu Asp Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val  
50 55 60

25 Ile Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His  
65 70 75 80

30 Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His  
85 90 95

35 Leu Ile Gly Thr Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln  
100 105 110

40 Lys Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Ser  
115 120 125

45 Ile Asp Pro Asp Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp  
130 135 140

50 Tyr Phe His Phe Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala  
145 150 155 160

55 Leu Thr Ile Ile Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser  
165 170 175

60 Asp Asn Leu Thr Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu  
180 185 190

65 Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly  
195 200 205

70 Gly Tyr Val Gln Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp  
210 215 220

75 Trp Ser Phe Ile Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His  
225 230 235 240

80 Glu Tyr Pro His Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala  
245 250 255

85 Lys

<210> 58  
5 <211> 26  
    <212> DNA  
10 <213> Künstliche Sequenz  
  
    <220>  
15 <221> Primer  
    <222> (1)..(26)  
20 <223>  
  
    <400> 58  
25 gtcgaccctg ctttaatgag atatgc  
    <210> 59  
30 <211> 27  
    <212> DNA  
    <213> Künstliche Sequenz  
35  
    <220>  
40 <221> Primer  
    <222> (1)..(27)  
    <223>  
45  
    <400> 59  
50 ctcgagcttg gacaatcagt aaattga  
    <210> 60  
    <211> 210  
55 <212> DNA  
    <213> Agrobacterium tumefaciens  
60  
    <220>  
    <221> Terminator  
65 <222> (1)..(210)  
    <223>  
70

26

27

5 <400> 60  
gtcgaccctg ctttaatgag atatgcgaga cgcctatgat cgcgatgatat ttgctttcaa 60  
ttctgttggtg cacgttgtaa aaaacctgag catgtgtagc tcagatcctt accgccggtt 120  
tcggttcatt ctaatgaata tatcacccgt tactatcgta tttttatgaa taatattctc 180  
cgttcaattt actgattgtc caagctcgag 210

10 <210> 61  
<211> 37

15 <212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

20 <220>  
<221> Primer

25 <222> (1)..(37)  
<223>

30 <400> 61 37  
cccgggaatt cttcattatt tcgattttga tttcgtg

35 <210> 62  
<211> 38  
<212> DNA

40 <213> Künstliche Sequenz

45 <220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(38)

50 <223>

55 <400> 62 38  
aagcttggtt gatcagaaga agaagaagaa gatgaact

60 <210> 63  
<211> 652  
<212> DNA

65 <213> Arabidopsis thaliana

70 <220>

&lt;221&gt; Promotor

&lt;222&gt; (1)..(652)

5 &lt;223&gt;

10 <400> 63  
 cccgggaatt cttcattatt tcgattttga tttcgtgacc agcgaacgca gaataccttg 60  
 ttgtgtaata ctttaccctg gtaaatcaaa aacaaaaagg cttttgagct ttttgtagtt 120  
 gaatttctct ggctgatctt ttctgtacag attcatatat ctgcagagac gatatcattg 180  
 15 attatttgag cttcttttga actatttcgt gtaatttggg atgagagctc tatgtatgtg 240  
 tgtaaacttt gaagacaaca agaaaggtaa caagtgaggg agggatgact ccatgtcaaa 300  
 20 atagatgtca taagaggccc atcaataagt gcttgagccc attagctagc ccagtaacta 360  
 ccagattgtg agatggatgt gtgaacagtt ttttttttga tgtaggactg aaatgtgaac 420  
 aacaggcgca tgaaaggcta aattaggaca atgataagca gaaataactt atcctctcta 480  
 25 acacttggcc tcacattgcc cttcacacaa tccacacaca tccaatcaca acctcatcat 540  
 atatctcccg ctaatctttt tttctttgat cttttttttt ttgcttatta tttttttgac 600  
 30 tttgatctcc catcagttca tcttcttctt cttcttctga tcaaccaagc tt 652

&lt;210&gt; 64

35 &lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

40

&lt;220&gt;

45 &lt;221&gt; Primer

&lt;222&gt; (1)..(29)

&lt;223&gt;

50

55 <400> 64  
 gagctctagc gcaatcttat gtggtacaa 29

&lt;210&gt; 65

60 &lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

65

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Primer

70

&lt;222&gt; (1)..(29)

&lt;223&gt;

5

<400> 65  
aagcttttct tgaaagtaaa gattgagtc

29

10

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 1773

15

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Petunia hybrida

20

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Promotor

25

&lt;222&gt; (1)..(1773)

&lt;223&gt;

30

<400> 66  
gagctctagc gcaatcttat gtggtacaaa tcttgattag tcgggaaaaa atgatgtggc 60

35

cctacaaatg gttggaggat gggagatttg gctctatcta gagttatgtg gttgttgaag 120

catttggtta ctctctgctg tggtagttgg catatccaca ttgtctcctt ccacttttat 180

gacaattacg tgaaagttaa ggggtgtttt gtctattttt gtgagggcct ttcttttcct 240

40

tccaggttgt tgaagatggg ccaattcgat tagaataatg ttttgagctt tagcatattc 300

tctctcgttt acacgattat agtaataatg atataggatg acagaagttg acacataaat 360

45

tttttattct ctccatttac tttaatccaa atctcaccta ccctaaactt ctttaatatg 420

tattcaatag tctatccgag taaattgtaa atttaacaac cattgataat attgacacct 480

actaacatat actagtaaag agaataattaa catggcacat ataatttgat gcaaaatgag 540

50

tatgatgaaa tttaaaccca aaatctcttg attttgacag tgtcaccttg acttgtaaac 600

taataagtca tgttttagtg gcagaaagac aaactcatcc accaactgta tagcaataaa 660

55

aaatagaaga atcttcctga ggcaaagttt tggaaaaatt aagagtggct gagatttaaat 720

ttcaacagga attagttcca cttaactttt aggttacgat acagtgctaa ttaaataact 780

taattgtatt agatatttct tgcacctaaa aaatttaaaa actgaaaaaa ggtagcaatc 840

60

aaaataaaca aaaggacaaa ataagtgaag ggtacagcca ccaaccctgg cggctcactg 900

tttggttggtt aaaacgtaga cttacacctt ccaaaatcta caactaaaat gaggcaataa 960

65

tactttgccc aaaattacca agaaaagaaa aagaaaggaa tcccttaata ttactctcct 1020

ccatttcaca ataaatatcc tagtttgact taaattagag tttaaaaaat gaaagacgac 1080

ttttaaaact tgtaatctaa aataaatcat agttaaatgt gtggctataa atcattgtat 1140

70

taacggtaaa gtggtaagtt taaaagttaa ttgttttcaa atataaaatt gtactatcat 1200



5 tcttttttggga atgggactaat aagaaaaacta tgacatccat tatggagcgg agggaggtatc 1260  
 tcctttttaac aataaccttt gtcccttcaa ttcaattatc agtatgcaaa cattaaaaat 1320  
 tattattgat gttaagtacc acatcatcct taatgataga atcatcgtag aacgcttttc 1380  
 caggcacaca ttcaaactag ttagaccagt accacacatc gaatattcca gacttctttg 1440  
 10 tttgaatagt cgactacatt ggataatgga acttctcga ttaacttcga attagtcgag 1500  
 cccaaaaataa tatatacgtc ggggtggaaaa ctataaaatg tttgacaaaa atgtcaaatt 1560  
 15 aatatatcaa tctgcaacaa ctttttcacc ttgagaacac agctgaaatt ttttaaaaag 1620  
 gtagttggtg aagctagtca gcgaatccca ttaccttcca ctctacctaa ccccttcac 1680  
 caacaacaaa tttctgtaat ttaaaaacta gccaaaaaag aactctcttt taaaaagagc 1740  
 20 caaagactca atctttactt tcaagaaaag ctt 1773

<210> 67

25 <211> 39

<212> DNA

30 <213> Künstliche Sequenz

<220>

35 <221> Primer

<222> (1) .. (39)

40 <223>

<400> 67  
 gcgcattgcat ctagaatga attttttgtga taaaccagt

39

<210> 68

50 <211> 37

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

55

<220>

60 <221> Primer

<222> (1) .. (37)

<223>

65

<400> 68  
 gcgcattgctc tagattacga attgggttact gaattgt

37

70

<210> 69  
 <211> 819  
 5 <212> DNA  
 <213> Nostoc punctiforme ATCC 29133  
 10  
 <220>  
 <221> CDS  
 15 <222> (5)..(802)  
 <223>  
 20  
 <400> 69  
 gcgc atg cat cta gaa atg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat 49  
 Met His Leu Glu Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr 15  
 1  
 5  
 10  
 25  
 gtt gca ata gag caa tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg 97  
 Val Ala Ile Glu Gln Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu 30  
 20  
 25  
 30  
 gtg att gtc ata gta att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt 145  
 Val Ile Val Ile Val Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe 45  
 35  
 tta cta gct att aat tat gcc aaa gtc cca att tgg ttg ata cct att 193  
 Leu Leu Ala Ile Asn Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile 60  
 50  
 gca ata gtt tgg caa atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca 241  
 Ala Ile Val Trp Gln Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala 75  
 65  
 cat gat gct atg cat ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat 289  
 His Asp Ala Met His Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn 95  
 80  
 85  
 90  
 45  
 aat ttt atc ggt tca cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat 337  
 Asn Phe Ile Gly Ser Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr 110  
 100  
 105  
 50  
 caa cag atg tta aag aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc 385  
 Gln Gln Met Leu Lys Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser 125  
 115  
 120  
 55  
 gaa gtt gac cca gat ttt cat gat ggt aag aga aca aac gct att ttc 433  
 Glu Val Asp Pro Asp Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe 140  
 130  
 135  
 60  
 tgg tat ctc cat ttc atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata 481  
 Trp Tyr Leu His Phe Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile 155  
 145  
 150  
 65  
 gta cta act atc cta ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat 529  
 Val Leu Thr Ile Leu Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His 175  
 160  
 165  
 170  
 70  
 caa ata aat ctc atc tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc 577  
 Gln Ile Asn Leu Ile Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser 190  
 180  
 185  
 att caa ctg ttt tat ttc gga aca ttt ttg cct cat cga gaa ccc aag 625

## 69

	Ile	Gln	Leu	Phe	Tyr	Phe	Gly	Thr	Phe	Leu	Pro	His	Arg	Glu	Pro	Lys	
				195					200					205			
5	aaa	gga	tat	gtt	tat	ccc	cat	tgc	agc	caa	aca	ata	aaa	ttg	cca	act	673
	Lys	Gly	Tyr	Val	Tyr	Pro	His	Cys	Ser	Gln	Thr	Ile	Lys	Leu	Pro	Thr	
			210					215					220				
10	ttt	ttg	tca	ttt	atc	gct	tgc	tac	cac	ttt	ggt	tat	cat	gaa	gaa	cat	721
	Phe	Leu	Ser	Phe	Ile	Ala	Cys	Tyr	His	Phe	Gly	Tyr	His	Glu	Glu	His	
		225					230					235					
15	cat	gag	tat	ccc	cat	gta	cct	tgg	tgg	caa	ctt	cca	tct	gta	tat	aag	769
	His	Glu	Tyr	Pro	His	Val	Pro	Trp	Trp	Gln	Leu	Pro	Ser	Val	Tyr	Lys	
		240				245					250					255	
20	cag	aga	gta	ttc	aac	aat	tca	gta	acc	aat	tcg	taatctagag	catgcgc				819
	Gln	Arg	Val	Phe	Asn	Asn	Ser	Val	Thr	Asn	Ser						
					260					265							
25	<210>	70															
	<211>	266															
	<212>	PRT															
	<213>	Nostoc punctiforme ATCC 29133															
30	<400>	70															
35	Met	His	Leu	Glu	Met	Asn	Phe	Cys	Asp	Lys	Pro	Val	Ser	Tyr	Tyr	Val	
	1				5					10					15		
40	Ala	Ile	Glu	Gln	Leu	Ser	Ala	Lys	Glu	Asp	Thr	Val	Trp	Gly	Leu	Val	
				20					25					30			
45	Ile	Val	Ile	Val	Ile	Ile	Ser	Leu	Trp	Val	Ala	Ser	Leu	Ala	Phe	Leu	
			35					40					45				
50	Leu	Ala	Ile	Asn	Tyr	Ala	Lys	Val	Pro	Ile	Trp	Leu	Ile	Pro	Ile	Ala	
		50					55					60					
55	Ile	Val	Trp	Gln	Met	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Ala	His	
		65				70					75					80	
60	Asp	Ala	Met	His	Gly	Ser	Val	Tyr	Arg	Lys	Asn	Pro	Lys	Ile	Asn	Asn	
					85					90					95		
65	Phe	Ile	Gly	Ser	Leu	Ala	Val	Ala	Leu	Tyr	Ala	Val	Phe	Pro	Tyr	Gln	
				100					105					110			
70	Gln	Met	Leu	Lys	Asn	His	Cys	Leu	His	His	Arg	His	Pro	Ala	Ser	Glu	
			115					120					125				
75	Val	Asp	Pro	Asp	Phe	His	Asp	Gly	Lys	Arg	Thr	Asn	Ala	Ile	Phe	Trp	
		130					135					140					
80	Tyr	Leu	His	Phe	Met	Ile	Glu	Tyr	Ser	Ser	Trp	Gln	Gln	Leu	Ile	Val	
		145				150					155					160	

5 Leu Thr Ile Leu Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln  
 165 170 175  
 10 Ile Asn Leu Ile Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile  
 180 185 190  
 15 Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys  
 195 200 205  
 20 Gly Tyr Val Tyr Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe  
 210 215 220  
 25 Leu Ser Phe Ile Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His  
 225 230 235 240  
 30 Glu Tyr Pro His Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln  
 245 250 255  
 35 Arg Val Phe Asn Asn Ser Val Thr Asn Ser  
 260 265  
 40 <210> 71  
 <211> 33  
 45 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 50 <220>  
 <221> Primer  
 55 <222> (1)..(33)  
 <223>  
 60 <400> 71  
 gcgcatgcat ctagaaatgg cgatcgccat tat 33  
 65 <210> 72  
 <211> 32  
 60 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 65 <220>  
 <221> Primer

&lt;222&gt; (1)..(32)

&lt;223&gt;

5

<400> 72  
gcgc atg cat cta gaa atg gcg atc gcc att att agt ata tgg gct atc  
gcgc atg cat cta gaa atg gcg atc gcc att att agt ata tgg gct atc

32

10

&lt;210&gt; 73

&lt;211&gt; 720

15 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Nodularia spumigena NSOR10

20

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

25 &lt;222&gt; (5)..(703)

&lt;223&gt;

30

<400> 73  
gcgc atg cat cta gaa atg gcg atc gcc att att agt ata tgg gct atc  
Met His Leu Glu Met Ala Ile Ala Ile Ile Ser Ile Trp Ala Ile  
1 5 10 15

49

35

agc cta ggt ttg tta ctt tat att gat ata tcc caa ttc aag ttt tgg  
Ser Leu Gly Leu Leu Leu Tyr Ile Asp Ile Ser Gln Phe Lys Phe Trp  
20 25 30

97

40

atg ttg tta ccg ctc ata ttt tgg caa aca ttt tta tat acg gga tta  
Met Leu Leu Pro Leu Ile Phe Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu  
35 40 45

145

45

ttt att aca gct cat gat gcc atg cat ggg gta gtt ttt ccc aaa aat  
Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Lys Asn  
50 55 60

193

50

ccc aaa atc aac cat ttc att ggc tca ttg tgc ctg ttt ctt tat ggt  
Pro Lys Ile Asn His Phe Ile Gly Ser Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Gly  
65 70 75

241

55

ctt tta cct tat caa aaa ctt tta aaa aag cat tgg cta cat cac cat  
Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His His  
80 85 90 95

289

60

aat cca gcc agt gaa aca gat cca gat ttt cac aac ggg aag cag aaa  
Asn Pro Ala Ser Glu Thr Asp Pro Asp Phe His Asn Gly Lys Gln Lys  
100 105 110

337

65

aac ttt ttt gct tgg tat tta tat ttt atg aag cgt tac tgg agt tgg  
Asn Phe Phe Ala Trp Tyr Leu Tyr Phe Met Lys Arg Tyr Trp Ser Trp  
115 120 125

385

70

tta caa att atc aca tta atg att att tat aac tta cta aaa tat ata  
Leu Gln Ile Ile Thr Leu Met Ile Ile Tyr Asn Leu Leu Lys Tyr Ile  
130 135 140

433

tgg cat ttt cca gag gat aat atg act tat ttt tgg gta gtt ccc tca  
Trp His Phe Pro Glu Asp Asn Met Thr Tyr Phe Trp Val Val Pro Ser  
145 150 155

481

5 att tta agt tct tta caa tta ttt tat ttt gga act ttt cta ccc cac 529  
 Ile Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His  
 160 165 170 175  
 agt gag cct gta gaa ggt tat aaa gag cct cat cgt tcc caa act att 577  
 Ser Glu Pro Val Glu Gly Tyr Lys Glu Pro His Arg Ser Gln Thr Ile  
 180 185 190  
 10 agc cgt ccc att tgg tgg tca ttt ata act tgt tac cat ttt ggt tat 625  
 Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr  
 195 200 205  
 15 cat tac gaa cat cat gaa tac ccc cat gtt cct tgg tgg caa tta cca 673  
 His Tyr Glu His His Glu Tyr Pro His Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro  
 210 215 220  
 20 gaa att tat aaa atg tct aaa tca aat ttg tgatctagag catgcgc 720  
 Glu Ile Tyr Lys Met Ser Lys Ser Asn Leu  
 225 230  
 <210> 74  
 25 <211> 233  
 <212> PRT  
 30 <213> Nodularia spumigena NSOR10  
 <400> 74  
 35 Met His Leu Glu Met Ala Ile Ala Ile Ile Ser Ile Trp Ala Ile Ser  
 1 5 10 15  
 40 Leu Gly Leu Leu Leu Tyr Ile Asp Ile Ser Gln Phe Lys Phe Trp Met  
 20 25 30  
 45 Leu Leu Pro Leu Ile Phe Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe  
 35 40 45  
 Ile Thr Ala His Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Lys Asn Pro  
 50 55 60  
 50 Lys Ile Asn His Phe Ile Gly Ser Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Gly Leu  
 65 70 75 80  
 55 Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His His Asn  
 85 90 95  
 60 Pro Ala Ser Glu Thr Asp Pro Asp Phe His Asn Gly Lys Gln Lys Asn  
 100 105 110  
 65 Phe Phe Ala Trp Tyr Leu Tyr Phe Met Lys Arg Tyr Trp Ser Trp Leu  
 115 120 125  
 70 Gln Ile Ile Thr Leu Met Ile Ile Tyr Asn Leu Leu Lys Tyr Ile Trp  
 130 135 140

## 73

His	Phe	Pro	Glu	Asp	Asn	Met	Thr	Tyr	Phe	Trp	Val	Val	Pro	Ser	Ile
145					150					155					160

5    Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser  
                    165                    170                    175

10      Glu Pro Val    Glu Gly Tyr Lys    Glu Pro His Arg Ser Gln Thr Ile Ser  
                180                       185                              190

15 Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His  
195 200 205

Tyr Glu His His Glu Tyr Pro His Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Glu  
210 215 220

Ile Tyr Lys Met Ser Lys Ser Asn Leu  
225 230

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP04/008624

International filing date: 31 July 2004 (31.07.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: EP  
Number: PCT/EP/03/09106  
Filing date: 18 August 2003 (18.08.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 24 January 2005 (24.01.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**